

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
C07K 7/06

(45) 공고일자 1993년08월25일  
(11) 공고번호 93-008091

(21) 출원번호	특1986-0005055	(65) 공개번호	특1987-0000359
(22) 출원일자	1986년06월24일	(43) 공개일자	1987년02월18일
(30) 우선권주장	P 35 33 512.2 1985년06월24일 독일(DE) P 35 46 150.0 1985년12월27일 독일(DE)		
(71) 출원인	책스트 아크티엔게젤샤프트 베른하르트 베크 하인리히 벡커 독일연방공화국 데-6230 프랑크푸르트 암 마인 80 브뤼닝스트라세 45		

(72) 발명자 권터 웅  
독일연방공화국 데-7400 튀빙겐 오베 데르 그라펜할데 5  
칼-하인쯔 비이스윔러  
독일연방공화국 데-7400 튀빙겐 스탁클레스트라세 10  
외르그 메츠거  
독일연방공화국 데-7400 튀빙겐 에베르트스트라세 5  
한스-외르그 뷔링  
독일연방공화국 데-7400 튀빙겐 아이첸베크 4  
게르하르트 벡커  
독일연방공화국 데-7404 오프터딩겐 아이차츠스트라세 37  
볼프강 베즐러  
독일연방공화국 데-7401 하겔로흐 도르베크베크 4  
(74) 대리인 이병호

심사관 : 공민호 (책자공보 제3385호)

(54) 막 앵커/활성화합물 접합체의 제조방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

막 앵커/활성화합물 접합체의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제 1 도는 Pam-Cys(C<sub>18</sub>)<sub>2</sub>-Ser-Ser-Asn-Ala-OH를 제조하기 위한 반응도식이다.

제 2 도는 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼표이다.

제 3 도는 CDCl<sub>3</sub> 중에서 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-OH×3TFA의 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼이다.

제 4 도는 CDCl<sub>3</sub> 중의 Pam-Cys(Pam)-OBut의 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼이다.

제 5 도는 CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 1 : 1 중의 Pam-Cys(Pam)-OH의 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼이다.

제 6 도는 Pam(α-Pam)Cys-OBut의 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼(J-조절 스핀-에코 스펙트럼)이다.

제 7 도는 α-나선의 <sup>13</sup>C NMR(100MHz)이다.

제 8 도는 HuIFN-(α-Ly)-11-20의 α-나선의 CD 스펙트럼이다.

제 9 도는 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-EGF-R(516 내지 529)를 사용하여 수득한 항체이다.

제 10 도는 생체내 면역화 실험에 대한 도표이다.

제 11 도는 생체내 시험관내 면역화 실험에 대한 비교도표이다.

제 12 도는 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> FITC를 사용하는 Ba(b/c) 마우스 비장세포의 유사분열성 활성화에 대한 도표이다.

#### [발명의 상세한 설명]

본 발명은 막 앵커(anchor)의 화합물들에 공유 결합되는 하나 이상의 활성화물을 갖는 막 앵커/활성화합물 접합체의 제조방법에 관한 것이다.

막 앵커 화합물은 생물학적 및 합성 막 내로 투과가능한 화합물이다.

예를들어, 상기의 막 앵커 화합물은 에스케리키아 콜라이의 외막으로부터 이미 분리하였고 또한 현재에는 합성가능한 천연의 막 지방단백질일 수 있다. 이 콜라이 막 앵커의 화합물은 S-글리세릴-L-시스테인에 결합된 세가지 지방산 N-말단영역으로 구성된다[참조; G. Jung et al, in "Peptides, Structure and Function", V. J. Hruby and D.H.Rich, 179-182페이지, Pierce Chem. Co. Rockford, Illinois, 1983]

더우기, 구조-안정화된  $\alpha$ -나선형구조의 폴리펩티드는 모델, 특히 알라메티신, 즉, 지방막에서 전압에 따른 이온 유발 시스템을 형성하는  $\alpha$ -나선형 양쪽성 아이코사펩티드 항생물질을 사용한 생물학적 막의 연구에서 이미 발표되었다[참조; Boheim, G., Hanke, W., Jung, G., Biophys. Struct. Mech. 9, 181-191pages(1983); Schmitt, H. 및 Jung, G., Liebigs Ann. Chem. 321-344 및 345-364page(1985)].

유럽 특허 제 A1-330호에는 1973년이래 공지된 이 콜라이로부터의 지방단백질 유사체인 지방펩티드의 면역 상승작용이 기재되어 있다.

또다른 유럽 특허원 제 A2-114787호는 시험관내에서 래트 및 마우스의 폐포 마크로파지를 활성화시키는 상기 형태의 지방펩티드의 능력을 다루고 있는데, 그 결과, 기질을 24시간동안 배양시킨후, 마크로파지는 종양세포를 제거할 수 있으며, 특히 마크로파지는 항체, 예를들어, 돼지 혈청 알부민에 대한 항체의 생성을 상당히 증가시킨다.

유럽 특허 제 A2-114787호는 면역보조제로서 상기의 지방단백질 유도체를 사용할 것을 제안하였는데, 즉, 면역 감응을 향상시키기 위해 항원과 혼합한 이 콜라이 막 단백질의 지방단백질 유도체를 사용하는 것을 말한다.

특히, 정제된 항원을 때때로 단지 소량으로 수득할 수 있기 때문에, 면역 감응을 자극하고 강력하게 하는 기질이 매우 필요하며; 또한, 신규의 항원이 사용되는 경우, 신규의 오염물질 또는 분해 생성물의 가능성이 항상 있게된다.

실험동물에 자주 접종하지 않고, 가능한 경우, 단일용량의 면역물질에 의해 원하는 면역감응을 수득하는 것이 더욱 바람직하다.

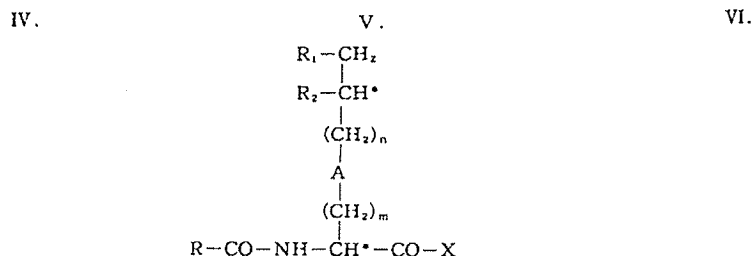
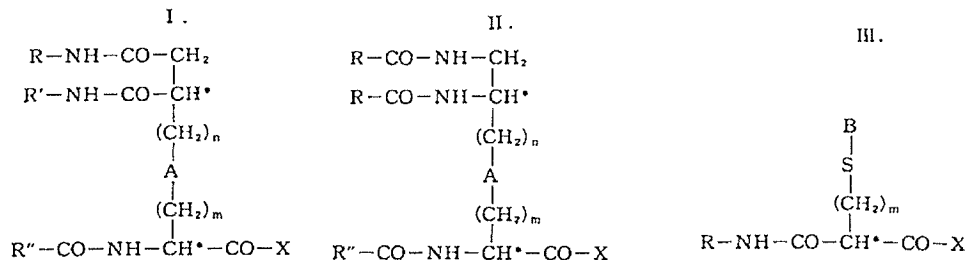
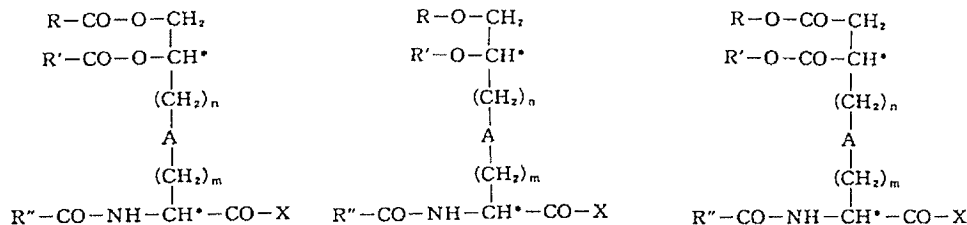
그러므로 본 발명의 목적은 항원 또는 합텐(hapten)에 대하여 항체의 형성을 증가시켜 특히 면역상승작용을 수득하는데 있다.

상기의 목적은 하나 이상의 막 앵커화합물과, 막 앵커화합물(들)을 공유결합된 하나 이상의 활성화화합물들의 신규의 막 앵커/활성화합물 접합체로써 본 발명에 따라 성취된다.

본 발명에 의한 막 앵커화합물의 제조 공정은 다음과 같다 : 고체 또는 가용성 담체[예를들어, 중합체, 예, 메리필드 수지(Merrifield resin)]상에서 공지된 커플링과정에 의해 반응이 일어나지 않도록 작용기를 문헌에 공지된 방법하에서 보호기로 보호시킨 펩티드를 합성하고; 이렇게 합성된 담체-결합 펩티드를 펩티드의 N-말단 또는 측쇄-기를 통해 막 앵커 화합물에 공유결합시키고; 이로써 제조된 중합체/펩티드 접합체를 문헌에 공지방법으로, 보호그룹과 펩티드/담체 결합을 분해시킴으로 분리하여; 막 앵커/펩티드 또는 막 앵커/활성화합물 접합체를 수득한다.

본 발명은 또한 생체내 및 시험관내에서 통상의 모노클로날 항체를 제조하기 위한 화합물의 용도에 관한 것이며; 또한 유리하게는, 합성 백신의 제조, 형광표지, 스핀 표지, 방사능 표지 등을 사용하는 세포표지물의 제조, 친화성 크로마토그래피, 특히 친화성 컬럼을 위해 세포용해를 촉진시키기 위한 본 발명 화합물의 유전공학적 용도; 리포솜 제제; 사람의 식료품 또는 동물 사료의 첨가물 및 미생물 배양배지, 일반적으로 세포 배양액의 첨가물로서의 사용이 가능하다. 적절한 경우, 본 발명의 화합물은 문헌에 공지된 부형제와 함께 사람 또는 가축용 약제용으로 액제, 연고제, 고체 담체에 흡착시킨 형태, 유제 또는 분무제의 형태로 사용될 수 있다.

막 앵커 화합물은 바람직하게는 하기 일반식중 한가지의 화합물이다.



VII.

상기식에서, A는 황, 산소 디설파이드(-S-S-), 메틸렌(-CH<sub>2</sub>-) 또는 -NH-일 수 있고, B는 A가 -S-S-인 일반식(I) 내지(V)에서와 같이, 치환된 S-알킬 라디칼, 즉, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-(치환된 알킬)-라디칼이며, n은 0 내지 5 이고, m은 1 또는 2 이며, C<sup>•</sup>는 R 또는 S 배위를 갖는 비대칭탄소원자이고, R, R' 및 R''는 동일하거나 상이하며, 탄소수 7 내지 25의 알킬, 알케닐 또는 알키닐 그룹이거나 수소로서, 하이드록실, 아미노, 옥소, 아실, 알킬 또는 사이클로알킬그룹으로 임의 치환될 수 있으며, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 동일하거나 상이하며, R, R' 및 R''의 정의와 같거나, -OR, -OCOR, -COOR, -NHCOR 또는 -CONHR 일 수 있고, X는 활성화합물 또는 스페이서(Spacer)-활성화합물 그룹이다.

유리하게는, 하기 일반식(VIII)의 본 발명에 따른 막 앵커/활성화합물 접합체를 사용할 수도 있다 : 일반식(VIII)의 화합물은 막 앵커 화합물[예를들어, N,N'-디아실린; N,N'-디아실오르니틴; 글루탐산의 디(모노알킬)아미드 또는 에스테르, 아스파르트산의 디(모노알킬)아미드 또는 에스테르, 세린, 호모세린 또는 트레오닌의 N,O-디아실 유도체, 및 시스테인 또는 호모시스테인의 N,S-디아실 유도체; 세린 및 호모세린]과 활성화합물 접합체가 될 수 있으며, 또한 바람직하다.



상기식에서, R<sub>3</sub>는 탄소수 7 내지 25, 바람직하게는 탄소수 10 내지 20, 특히 바람직하게는 탄소수 14 내지 18의 α-아실-지방산 잔기; 에스테르 그룹이 바람직하게는 직쇄 또는 측쇄이고 탄소수 8 이상, 바람직하게는 약 10 내지 20, 특히 바람직하게는 탄소수 14 내지 18인 α-알킬-β-하이드록시-지방산 잔기 또는 이의 α-하이드록시 에스테르이고, R<sub>4</sub>는 아미노산의 측쇄이거나 수소이며, X는 수소 또는 스페이서-활성화합물 그룹이고, R<sub>3</sub>가 리신, 오르니틴, 글루탐산, 아스파르트산 또는 이의 유도체의 측쇄인 경우 결합될 막 앵커 화합물은 동일한 분자의 α 또는 ω 위치에서 에스테르 방법 및 아미드방법에 의해 R<sub>4</sub>에 결합될 수 있다.

막 앵커/활성화합물접합체는 다음의 방법에 의해 제조함이 특히 바람직하다 : 중합체(예를들어, 메릴필드 수지)와 같은 고체 또는 가용성 담체상에서 공지된 커플링 방법에 의해, 반응이 일어나지 않도록 작용기를 문헌에 공지된 방법에 의해 보호그룹으로써 보호시켜 펩티드를 합성하고; 이렇게 합성된 담체-결합 펩티드를 펩티드의 N-말단 또는 측쇄-기를 통해 막 앵커 화합물에 공유결합시키고; 상기와 같이 제조된 펩티드 접합체를 문헌에 공지된 방법으로, 보호그룹과 펩티드/담체의 결합을 분해시킴으로써 분리시켜, 막 앵커 펩티드 또는 막 앵커/활성화합물 접합체를 수득한다.

펩티드와 막 앵커 화합물의 연결은 축합, 첨가, 치환 또는 산화반응(예를들어 디설파이드 형성)에 의해 생성될 수 있다. 유리한 방법으로는 막 앵커로서 교호 아미노산 서열을 갖는 안정화 구조의  $\alpha$ -알킬아미노산 나선을 사용할 수 있으며,  $\alpha$ -나선은 다른 아미노산[예를들어, X-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)n-Y형(여기서, n은 2 내지 4 이고, X 및 Y는 공지된 보호기 또는 -H, -OH 또는 -NH<sub>2</sub>이다)]이다]에 의해 불안정화되지 않는다.

적절하다면 서로 다른 두개의 막 앵커 화합물에 공유결합된 활성화합물이 바람직하다.

추가로, 활성화합물은 면역화 목적으로 문헌에 공지된 보조제(예를들어, 무라밀디펩티드 및/또는 지방다당류)에 공유로 결합될 수도 있다.

활성화합물의 예는 다음과 같다 : 항원[예를들어, 단백질 또는 접합단백질{예를들어, 당단백질, 비루스성외피단백질, 세균세포벽 단백질 또는 프로토조아(항원 결정인자, 에피토프)의 단백질}의 저분자량 부분서열], 온전한 단백질, 항생물질, 세균막 성분(예를들어, 무라밀디펩티드, 지방다당류), 천연 또는 합성합텐, 항생물질, 호르몬(예를들어, 스테로이드), 뉴클레오사이드, 뉴클레오티드, 핵산 효소, 효소기질, 효소억제제, 비오틴, 아비딘, 폴리에틸렌글리콜, 펩티드성 활성화합물(예를들어, 투프트신, 폴리리신), 플루오레센스 표지물(예를들어, FITC, RITC, 덴실, 루미놀 또는 코우마린), 바이오루미네센스 표지물, 스피노지, 알칼로이드, 스테로이드, 바이오겐성 아민, 비타민 또는 독성물질(예를들어, 디곡신, 팔로이딘, 아마니틴, 테트로독신 등), 착물형성제 또는 약이다.

활성화합물의 특성은 본 발명의 물질이 나타내는 용도가 완전히 신규한 영역으로 측정된다.

여러가지의 막 앵커/활성화합물 접합체 화합물은 지방부위 및/또는 활성화합물 부위에서 함께 가교결합되는 것이 또한 유리할 수 있다.

막 앵커 화합물 및 활성화합물은 활성화합물이 막으로부터 더 멀리 떨어져 막 앵커에 의해 부착되도록 가교결합제를 통해 함께 연결될 수도 있다.

적절한 가교결합제의 예는 디카복실산 또는 디카복실산 유도체, 디올, 디아민, 폴리에틸렌글리콜, 에폭사이드, 알레산유도체 등이다.

본 발명에 따라, 특히 면역화에 적절하고 담체/항원/보조제와 함께 공유결합된 것으로 명확히 정의된 저분자량 접합체가 제조된다. 담체 및 보조제는 유사분열성 활성을 갖는 지방펩티드[예를들어, 트리팔미토일-S-글리세릴-시스테인(Pam<sub>3</sub> Cys)] 및 이의 유사체뿐만아니라, 친지방성 안정화구조의  $\alpha$ -나선 및 이의 조합체(예를들어, Pam<sub>3</sub> Cys-항원-나선,  $\alpha$ -나선-항원-나선, 또는 Pam<sub>3</sub> Cys-항원 또는 항원-Pam<sub>3</sub> Cys(N-또는 C-단말연결), 및 항원-나선 또는 나선-항원[N-또는 C-말단 또는 Glu, Lys 등의 측쇄상의 나선에 혼입될]일 수 있다. 따라서, 신규화합물은 이제까지 사용된 고분자량 담체기질(예를들어, 혈청알부민, 글로부린 또는 폴리리신과 같은 단백질) 또는 일반적으로 고분자량 선행 또는 가교결합 중합체와 함께 항원의 모든 고분자량 접합물과는 본질적으로 다르다.

그러나 특히, 신규화합물은 단지 혼합되어 있을뿐인 지금까지의 모든 공지의 보조제와는 다르며, 세포표면에서 항원의 대부분 특이적인 표현을 나타내지 않는다. 이제까지 공지된 보조제들은 종종 다수의 면역을 필요로 하였으며 동물시험에서 염증반응을 나타내기도 하였다. 본 발명의 특별한 장점은 피로겐이 없이 순수하며, 화학적으로 명확히 정의된 화합물을 재현 가능성있게 제조할 수 있다는 점이며, 통상의 화합물 또는 여러가지 물질의 혼합물과 비교하여 상기 화합물은 항체형성의 재현성에 있어서 향상된 결과를 나타낸다. 그러므로, 신규 접합체는 첫번째 접종에 대해 면역강응을 특이적으로 자극하는 작용을 갖는데 반하여, 이제까지 사용된 보조제들은 면역강응을 단지 비특이적으로 자극하기 때문에, 본 발명에 따른 화합물의 특정 사용범위는 항체생성, 유전공학, 합성백신의 제조, 가축 및 인체 약제에 있어서 진단 및 치료의 범위에 걸쳐있다. 놀랍게도, 본 발명의 화합물을 사용하여, 면역원성이 약한 화합물을 면역원성이 강한 화합물로 전환시킬 수 있다. 즉, 본 발명의 특히 중요한 점은, 신규의 면역원이 시험관내에서 매우 활성이 크므로, 동물실험 없이 사용할 수 있음과 항체제조 비용에 관한 점이다. 더우기, 면역화 방법이 염증성이 아니므로, 다른 항체를 수득하기 위해 동물에 수회 사용할 수 있다.

최종적으로, 다가의 백신을 제조하기 위한 신규의 면역원, 즉 예를들어 이의 측쇄에 여러개의 항원 또는 합텐이 연결되어 1회 면역에 의해 여러가지 다른 작용의 항체가 제조될 수 있는 막 앵커를 사용할 수도 있다.

수용성 유사분열성 지방 앵커 그룹의 한가지 예는 Pam<sub>3</sub> Cys-Ser(Lys)n-OH이며, 이는 형광성, 방사성 및 생물학적 활성 세포표지물을 제조하는데 뿐만 아니라 신규 면역원의 제조에도 특히 적합하다. 본 발명의 막 앵커/활성화합물 접합체의 특히 바람직한 성질은 이들의 양쪽성, 즉, 부분적인 수-용해성인데, 이는 동물에 대해 생물학적 시험 및 살아있는 세포를 사용하는 연구를 수행하는데 더욱 바람직하다. 더우기, 몇가지 실험에서 필요한 인공의 지방 이중막, 리포솜 및 소포를 제조할 수 있으며, 이는 단지 수성매질에서 안정하다.

적절한 양쪽성 생물학적 활성 막 앵커의 예는 Pam<sub>3</sub> Cys-Ser(Lys)n-OH이다. Pam<sub>3</sub> Cys에 커플링된 세린잔기는 면역원 성질을 갖는 반면에, 리신잔기의 극성 양성자화된  $\epsilon$ -아미노그룹은 분자의 친수성 부위를 나타낸다. 이의 다수의 전하 때문에, 상기 형태의 화합물은 더욱 흥미있는 성질을 갖는다. 세포 간 상호작용이 유발되어, 특히 리신 쇄가 비교적 길거나, 폴리에틸렌 글리콜에 커플링되거나, 비오틴/아비딘 시스템의 공유적인 혼입의 경우, 상기 화합물은 하이브리도마 세포의 제조에 있어 용해 촉진제로 사용될 수 있다.

더우기, 유리하게는 본 발명의 화합물은 가교결합에 의해 신규 리포솜 제조에 사용할 수 있으며, 가교결합은 지방산 잔기 또는 펩티드잔기에서 일어날 수 있다.

막 앵커(Pam<sub>3</sub> Cys 및 그의 유사체, 및 나선)는 이들이 비오틴/아비딘시스템과 공유결합하는 경우, 세포/세포 상호작용의 상승에 적절하다. 본 발명의 화합물의 그밖의 장점은 이들이 유전공학 연구에 필요한 세포 융해를 촉진시키는 점이다. 또한, 신규 면역원은 ELISA, RIA 및 바이오루미네센스(bioluminescence) 분석에 사용할 수도 있다.

여러가지 Pam<sub>3</sub> Cys 유도체는 지방-및 수-용해성이며 생체내 및 시험관내에서 강력한 유사분열성 작용을 갖는다. 이들은 또한 FITC 및 RITC, 데실 및 코우마린과 같은 다른 표지물로 세포를 표지하기에 매우 적절하다. 특히, 상기 유도체는 형광 현미경 및 형광 활성화 세포분리(FACS)에 사용할 수도 있다.

Pam<sub>3</sub> Cys와 유사한 작용을 갖는 적절한 가격의 막 앵커는 S-(1,2-디옥타데실옥시카보닐에틸)시스테인이며 이의 제조방법은 실시예에서 상세히 기술한다.

유사분열성 활성 지방 앵커와 항원의 특이적 커플링은 예를들어 일반식 X-NH-NH-CO-A-CO-B-Y 또는 X-NH-NH-CO-A-COOH(여기서, A 및 B는 아미노산 또는 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>이고, X 및 Y는 문헌에 공지된 보호기이다)의 디카복실산 모노하이드라지드 유도체를 사용하는 가교 결합제에 의해 수행될 수 있다.

신규의 물질을 제조하는데 모든 적절한 가교결합제 또는 스페이서(Spacer)를 사용할 수도 있으며, 본 발명의 특히 바람직한 양태는 지방막 앵커 기능 및/또는 안정화된 구조의 나선을 갖는 지방 펩티드 구조를 함유하는 한, (자분자량 담체 및 보조제)-(항원)원리에 의해 나타내어진다.

특히 유리한 효과는 친화성 크로마토그래피에 본 발명의 화합물을 사용함으로써 밝혀질 수 있는데, 이러한 목적으로는 지방펩티드-항원(합텐) 접합체가 특히 적절하다. 지방펩티드-항원(합텐) 접합체는 통상의 역상 HPLC 컬럼(또는 RP 컬럼의 제조)에 적용시키기에 특히 적절한데, 이는 예를들어, 비극성 알킬종에서 유기수성시스템에 적용되는 트리팔미토일 화합물의 결합을 초래한다. 이동수성상에 항원을 전개시키면 세포표면에서와 동일하게 남는다. 즉 항체의 흡착이 일어난다. 그러므로, 상기 형태의 친화성 컬럼에 희석시킨 혈청을 직접 적용하여 적절한 항원과 특이적으로 반응하는 항체를 강화시키거나 분리시킬 수 있다. 항체의 용출은 예를들어 pH를 조절함에 의해 다른 친화성 컬럼과 같이 수행한다.

이제, 본 발명의 하기의 실시예로 자세히 설명하고자 한다. 사용된 약자는 다음과 같다 :

Aib=2-메틸알라닌

TFA=트리플루오로아세트산

EGF R=표피 성장인자 수용체

Pam=팔리토일 라디칼

DCC=디사이클로헥실카보디이미드

DMF=디메틸포름아미드

FITC=플루오레세인 이소티오시아네이트

Fmoc=플루오렌일메톡시카보닐

But=3급-부틸라디칼

Ps-DVB=4-(하이드록시메틸)페녹시메틸 앵커그룹을 갖는 스티렌/디비닐벤젠 공중합체

HoBt=1-하이드록시벤조트리아졸

RITC=로다민 이소티오시아네이트

Hu IFN-(Ly) 11-20=인체 인터페론의 항원성 결정인자

DCH=디사이클로헥실우레아

EE=에틸아세테이트

본 발명의 물질 및 이의 전구체를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[실시예 1]

[Pam<sub>3</sub>Cys-EGF-R(516-529)의 제조]

EGF-R 단편(526-529)의 통상적인 단계적 합성[N α-Fmoc/(But), DCC/HoBt 및 유사무수물을 사용하여 보호하는 메리필드합성법]후, 부착된 최종의 아미노산은 Fmoc-Ser(But)-OH이다. 피페리딘/DMF(1 : 1, 15분)으로 Fmoc기를 제거한후, EDF-RH-Ser-(But)-Asn-Leu-Leu-Glu(OBut)-Gly-GLU(OBut)-Pro-Arg(H+)-Glu-OBut)-Phe-Val-Glu-(OBut)-Asn-Ser(But)-O-p-알콕시벤질-공중합(디비닐벤젠/스티렌)의 수지-결합 펩타이드(1g, 0.5mmol/g중량)를 Pam-Cys(CH<sub>2</sub>-CH(OPam)CH<sub>2</sub>(OPam)(2mmol, DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 1)중) 및 DCC/HoBt(2mmol, 0°C에서 20분간 예비활성)(16시간)과 연결시킨다음 2차커플링(4시간)시킨다. 리포헥사 데카펩티드를 티오아니솔(0.25ml)에 가하여 2시간내에 트리플루오로아세트산(5ml)으로 분해시킨다.

[수율]

960mg=(76%) Pam-Cys(CH<sub>2</sub>-CH(OPam)CH<sub>2</sub> (OPam)) Ser-Asn-Leu-Leu-Glu-Gly-Glu-Pro-Arg-Glu-Phe-Val-

Glu-Asn-Ser-OH $\times$ CF<sub>3</sub>COOH(정확한 아미노산 분석, 라세미화 되지 않음)

[실시예 2]

[S-(1,2-디옥타데실옥시카보닐에틸)-N-팔미토일-L(또는 D)시스테인 3급-부틸 에스테르의 제조]

디옥타데실 말리에이트는 일반적인 에스테르화 방법에 의해 수득될 수 있다[참조: H. Klostergaard, J Org. Chem. 23(1958), 108].

[<sup>13</sup>C NMR 스펙트럼]

제 2 도 참조

N-팔미토일-L-시스테인 3급-부틸에스테르 1.2mmol(500mg) 및 디옥타데실 말리에이트 1.2mmol(745mg)을 THF 20ml에 용해시킨다. N,N,N',N'-테트라메틸 에틸렌 디아민 20mmol(3ml)을 가한후, 이 혼합물을 질소하에서 환류 응축기를 사용하여 12시간 동안 교반시킨다. 메탄올 100ml 및 물 5ml을 가한후, 무색 침전물을 흡입 여과시키고, 물 및 메탄올로 세척한후, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>상의 진공하에 건조시킨다.

[수율]

1g(83%)

[용점]

51℃

[박층크로마토그래피]

Rf=0.80(이동상 : CHCl<sub>3</sub>/에틸아세테이트=14 : 1)

[<sup>13</sup>C-NMR]

제 2 도 참조

[분자량]

C<sub>63</sub>H<sub>113</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S(1035.7)

[원소분석]

계산치 : C ; 72.99, H ; 11.76, N ; 1.35, S ; 3.09

실측치 : C ; 73.08, H ; 11.92, N ; 1.27, S ; 3.27

[실시예 3]

[S-(1,2-디옥타데실옥시카보닐에틸)-N-팔미토일 시스테인 제조]

실시예 2 에 기재된 3급-부틸에스테르 0.48mmol(500mg)을 밀폐용기내 실온에서 1시간 동안 아세트산 65.3mmol(7.45g, 5ml)중에 교반시킨다. 이 혼합물은 고진공중에서 회전증발기로 증발시키고, 잔사를 클로로포름 1ml에 가하고, -20℃에서 침전물에 석유 에테르 50ml를 가하고, 생성물을 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 상의 진공하에 건조시킨다.

[수율]

450mg(89%)

[용점]

64℃

[실리카겔 플레이트상에서의 박층크로마토그래피]

Rf=0.73(이동상 : CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O=65 : 25 : 4)

[<sup>13</sup>C-NMR]

표 1 참조

[분자량]

C<sub>59</sub>H<sub>113</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S(980.6)

[원소분석]

계산치 : C ; 72.27, H ; 11.62, N ; 1.43, S ; 3.27

실측치 : C ; 72.46, H ; 11.75, N ; 1.36, S ; 3.50

신규 시스테인 유도체 및 이의 3급-부틸에스테르는 실리카겔 및 RP 크로마토그래피 상에서 부분임체 이성체로 분리될 수 있다. 즉, L-및 D-시스테인 유도체의 두쌍의 부분임체이성체를 제조할 수 있다.

[실시예 4]

[S-(1,2-디옥타데실옥시카보닐에틸)-N-팔미토일-Cys-Ser(But)-Ser(But)-Asn-Ala-0But 의 제조]

S-(1,2-디옥타데실옥시 카보닐에틸)-N-팔미토일시스테인 0.2mmol(196mg)을 디클로로메탄 5ml에 용해시키고, DMF 0.5ml 및 DCC 0.2mmol(41mg)중의 HoBt 0.2mmol(27mg)를 사용하여 0℃에서 30분간 교반시켜 예비 활성화시킨다.

디클로로메탄 3ml중의 H-Ser(But)-Ser(But)-Asn-Ala-0But 0.2mmol(109mg)를 가하고, 이 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반시킨다. 후처리하지 않고 메탄올 40ml을 상기 반응혼합물에 가한다. 무색 생성물을 3시간후에 흡인여과시킨다. 이를 소량의 디클로로메탄에 용해시키고, 메탄올로 다시 침전시킨다. 메탄올로 세척한후, 진공중의 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>상에서 건조시킨다.

[수율]

260mg(86%)

[용점]

194℃

[박층크로마토그래피]

Rf=0.95(이동상 : CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O=65 : 25 : 4)

Rf=0.70(이동상 : CHCl<sub>3</sub>/MeOH/빙초산=90 : 10 : 1)

[<sup>13</sup>C-NMR]

제 2 도 참조

[분자량]

C<sub>84</sub>H<sub>158</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S(1508.3)

[원소분석]

계산치 : C ; 66.89, H ; 10.56, N ; 5.57

실측치 : C ; 67.10, H ; 10.41, N ; 5.52

[실시예 5]

[S-(1,2-디옥타데실옥시카보닐에틸)-N-팔미토일-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala의 제조]

보호된 지방펩티드(IV) 53μmol(80mg)를 밀폐용기내 실온에서 1시간 동안 트리플루오로아세트산 13mmol(1.5g, 1ml)과 함께 교반시킨다. 고진공하에서 증발시킨후, 잔류물을 각각 디클로로메탄 10ml에서 2회 용해시키고, 매번 회전증발기로 증발시킨다. 잔류물을 클로로로름 3ml에 용해시키고, 4℃에서 12시간동안 메탄올5ml을 사용하여 침전시킨다. 생성물을 흡인여과하고, 메탄올로 세척한 다음 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>상에서 진공 건조시킨다.

[수율]

63mg(87%)

[용점]

208℃(분해)

[박층크로마토그래피]

Rf=0.63(이동상 : CHCl<sub>3</sub>/MeOH/빙초산/H<sub>2</sub>O=64 : 25 : 3 : 4)

Rf=0.55(이동상 : CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O=64 : 25 : 4)

Rf=0.06(이동상 : CHCl<sub>3</sub>/MeOH/빙초산=90 : 10 : 1)

[아미노산 분석]

시스테인 0.6 ; 아스파르트산 0.93 ; 세린 1.8 ; 알라닌 1.0

[분자량]

C<sub>72</sub>H<sub>134</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S(1340)

[실시예 6]

[Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-OH의 제조]

Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-OH는 N-Fmoc-아미노산 및 산-불안정 측쇄 보호기(세린에 대한 But 및 리신에 대한 Boc)를 함유하는 p-알콕시벤질알코올/PS-DVB(1%) 공중합체상의 고체-상법(MERRIFIELD)에 의해 합성된다. Fmoc-아미노산의 대칭무수물이 사용된다. Pam<sub>3</sub>Cys-OH에 대한 크플링은 OCC/HoBt법에 의해 수행되며, 가능한한 거의 정량적인 전환을 성취하기 위해 반복한다. 담체수지로 지방펩티드를 분해하고 측쇄 보호기를 제거하기 위해, 수지를 트리플루오로아세트산으로 1.5시간 동안 2회 처리한다

음 고진공하의 회전증발기로 산을 제거한다. 생성물을 아세톤에서 재결정화시킨다.

원소분석 및  $^{13}\text{C}$  스펙트럼은 지방펩티드가 트리플루오로아세테이트 형태임을 나타낸다.  $\text{Pam}_3\text{Cys-Ser-(Lys)}_4\text{-OH}$ 가 양쪽성이온 형태인 것으로 가정하면, 아직 3개의 트리플루오로아세트산 분자에 의해 양성자화될 수 있는 세개의  $\epsilon$ -아미노기가 남아있게 된다.

$\text{Pam}_3\text{Cys-Ser-(Lys)}_4\text{-OH} \times 3\text{TFA}$ 의  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼은 상기 화합물이 트리플루오로아세테이트 형태임을 나타낸다(110-120ppm에서  $\text{CF}_3$  기의 사중선 및 161-162ppm에서 카보닐 시그널). 분자의 극성부가 응집하므로, Lys 및 Ser의 탄소원자에 대한 선은 매우 브로드(broad)하게 된다. 206.9ppm에서의 카보닐시그널은 재결정화시 사용된 아세톤에 의해 생성되며 계속 부착되어 남아있다.

[분자량]

1510.4

[원소분석]

계산치 : C ; 56.40, H ; 8.70, N ; 7.56, S ; 1.73

실측치 : C ; 55.58, H ; 9.33, N ; 6.54 S ; 2.61

[아미노산 분석]

아미노산 분석은 리신에 대한 세린의 비가 1 : 4.2 인 것으로 나타났다. 가수분해(6N HCL, 110°C, 18시간) 시키는 동안 생성되는 S-글리세릴시스테인의 특정분해생성물이 존재한다(표준물질과 비교). 펩티드함량은 83%로 계산된다. 지방펩티드당 3TFA 분자는 펩티드 함량 80.2%에 상응하며, 이는 상기 분석과 잘 일치한다.

[실시에 7]

[ $\text{Pam}_3\text{Cys-Ser(Lys)}_4\text{-OH} \times 3\text{TFA}$ 의 제조]

① 담체수지에 Fmoc-Lys(Boc)-OH의 커플링

0°C에서 DMF/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1 : 1(v/v) 15 내지 20ml중의 Fmoc-Lys(Boc)-OH(4.5g, 9.6mmol)을 DCC(0.99g, 4.8mmol)와 혼합시킨다. 30분 후, 침전된 우레아를 p-벤질옥시벤질 알코올 수지(2.5g 1.6mmol)의 애기)를 함유하는 진탕용기내로 직접여과시켜 제거한다. 피리딘(0.39ml, 4.8mmol)을 가한 후, 혼합물을 실온에서 18시간 동안 진탕시킨다. 용매를 흡인여과하여 제거하고, 수지를 각 20ml씩의 DMF/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  및 DMF로 3회 세척한다. 수지를  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20ml에 가한 다음 우선 피리딘(28.8ml, 6당량)과 혼합시키고 벤조일 클로라이드(28.8ml, 6당량)와 혼합한다. 이 혼합물을 실온에서 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 흡인여과하여 제거하고, 수지를 20ml의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , DMF, 이소프로판올 및 PE 30/50으로 각각 3회 세척한다.

② 대칭 Fmoc-아미노산 무수물

Fmoc-Lys(Boc)-OH(4.5g, 9.6mmol, 3당량)을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /DMF 15ml에 용해시키고, 0°C에서 DCC(4.8mmol, 1.5당량)를 가한다. 0°C에서 30분후, 반응기내로 우레아를 직접 여과시켜 제거하고, 하기 표에 기재된대로 계속 반응시킨다.

하기의 과정은 출발시 사용되는 수지의 양 1/5(0.5g, 0.32mmol의 애기)에 적용한다.

Fmoc-O-부틸-세린(0.74g, 1.91mmol)을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /DMF 4ml에 용해시키고, 0°C에서 DCC(0.96mmol)을 가한다.



[표]

대칭 Fmoc-아미노산 무수물을 사용하는 펩티드의 연속적인 합성

과 정	시 약	시간(분)	횟 수
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	2
2	DMF	2	2
3	55% 피페리딘/DMF(v/v)	5	1
4	55% 피페리딘/DMF(v/v)	10	1
5	DMF	2	3
6	이소프로판올	5	2
7	DMF	2	3
8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	3
9	DMF	2	2
10	DMF/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 : 1(v/v)중에서 3당량의 대칭 Fmoc-아미노산 무수물과 커플링 ; 15분후 3당량의 NMM을 가함		
11	DMF	2	3
12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	3
13	카이저(kaiser)시험에 의해 커플링의 완전성을 확인 ; 필요한 경우 10-12단계를 반복		
14	아세틸화 : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 20ml중의 2당량의 AC <sub>2</sub> O 및 0.5당량의 NMM	15	1
15	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	3
16	이소프로판올	2	3
17	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	3

30분 후, 0℃의 반응기내에서 우레아를 직접 여과시켜 통상대로 계속 반응시킨다.

#### ③ Pam3Cys-OH에 커플링

Pam<sub>3</sub> Cys-OH(0.58g, 0.64mmol)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /DMF 1 : 1(v/v) 5ml에 용해시키고, 0℃에서, HoBt(93mg, 0.64mmol) 및 DCC(0.64mmol)와 혼합시킨다. 0℃에서 30분후, 이 혼합물을 반응기에 직접 붓는다. 16 시간동안 진탕시킨후, 상기와 같은 물비를 사용하여 4시간 동안 2차 커플링을 수행한다. 흡인여과하여 용매를 제거하고, 수지를 DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20ml 및 DMF로 각각 3회 세척한다.

#### ④ 중합체로부터 헥사펩티드의 분해

실시에 7 ③으로부터의 Boc-보호된 펩티드/중합체 수지 화합물(약 1g)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 로 완전히 세척하고 TFA 5ml 및 아니솔 0.5ml의 혼합물과 함께 1.5시간씩 2회 진탕시킨다. 여액을 진공하에 증발시키고, 잔류물을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5ml에 용해시킨다. -20℃에서 아세톤 50ml를 가한 후 결정화된 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)-OH×3TFA를 원심분리하여 제거하고 고진공하에서 건조시킨다.

[수율]

0.41g(85%)

[용점]

205℃(분해)

[실리카겔 플레이트상에서의 박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>=0.42(이동상 : n-BuOH/피리딘/H<sub>2</sub>O/빙초산=4 : 1 : 1 : 2)

R<sub>f</sub>=0.82(이동상 : n-BuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O/빙초산=10 : 4 : 10 : 6)

[아미노산 분석]

Ser 0.95(1) ; Lys 4(4)

[분자량]

C<sub>87</sub>H<sub>159</sub>N<sub>10</sub>O<sub>19</sub>SF<sub>6</sub>, (1852.6)

[원소분석]

계산치(%) : C ; 56.40, H ; 8.70, N ; 7.56, S ; 1.73

실측치(%) : C ; 55.58, H ; 9.33, N ; 6.94, S ; 2.61

[실시예 8]

[Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-OH-FITC × 2TFA의 제조]

플루오레세인 이소티오시아네이트(3.9mg, 10 μmol)를 클로로포름 2ml에 용해시키고, 클로로포름 2ml 중의 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser(Lys)<sub>4</sub>-OH × 3TFA(18.5mg, 10 μmol)용액에 가한다.

4-메틸모르폴린(10 μl, 10 μmol)을 가한 후, 혼합물을 1시간 동안 교반시키고, 회전증발기에서 용매를 제거한다. 잔류물을 클로로포름/아세톤 1 : 1 10ml에 용해시킨다. -20℃에서 황색 생성물이 부피가 큰 침전물로 형성되는데, 이를 원심분리하여 제거하고 고진공하에서 건조시킨다.

[수율]

세파덱스(Sephadex) LH 20상에서 정제 후 생성물 16mg은 트리플루오로아세테이트 형태이며, 366nm의 UV를 사용하여 여기시키면 형광이 매우 강하다. 출발물질과 비교하여보면, 아미노산이 FITC에 공유 결합되었다. 양쪽성 이온구조를 유지하는 것으로 가정하여 분자식이 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Cys)<sub>4</sub>-OH-FITC-2TFA이다.

[분자량]

C<sub>106</sub>H<sub>169</sub>N<sub>11</sub>O<sub>22</sub>S<sub>2</sub>F<sub>6</sub>(2127.68)

[실리카겔 플레이트 상에서의 박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>=0.72(이동상 : n-부탄올/피리딘/물/빙초산=4 : 1 : 1 : 2)

R<sub>f</sub>=0.73(이동상 : n-부탄올/포름산/물=7 : 4 : 2)

[아미노산 분석]

Ser 1.11(1.00), Lys 4.00(4.00)

글리세닐시스테인의 가수분해 생성물이 존재한다.

[실시예 9]

[Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-OH × 3HCl의 제조]

Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-OH × 3TFA(185.2mg, 0.1mmol)을 소량의 클로로포름에 용해시키고, 여기에 거의 비슷한 용적의 에테르성 HCl용액을 가한다. 이 혼합물을 격렬히 진탕시키면, 침전이 형성되나 주생성물은 용액으로 남아있게 된다. 이 혼합물을 회전증발기에서 무수상태로 증발시키고, 에테르/HCl을 다시 가한다. 이 과정을 수회 반복한 다음, 잔류물을 소량의 클로로포름에 용해시키고, 용액이 탁해 질 때까지 아세톤을 가한다.

생성물이 -20℃에서 무색 분말로서 결정화되는데, 이를 흡인여과시키고 고진공하에서 건조시킨다.

[수율]

153mg

[분자량]

C<sub>81</sub>H<sub>159</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>SCl<sub>3</sub>(1619.63)

[원소분석]

계산치 : C ; 60.07, H ; 9.89, N ; 8.65

실측치 : C ; 57.64, H ; 11.20, N ; 8.39

과량의 HCl이 여전히 생성물에 부착되어 있다.

[장-탈착 질량스펙트럼]

M<sup>+</sup> 피크가 M<sup>+</sup> +1 및 M<sup>+</sup> +2와 함께 m/e 1510에서 나타난다. m/e 909, 910, 911 및 912에서 양성자화된 단편 Pam<sub>3</sub>Cys-NH(908.5)가 나타난다.

[실시예 10]

[N,S-디팔미토일시스테인 3급-부틸에스테르]

팔미트산(2.5g, 9.6mmol), 디메틸아미노피리딘(130mg, 0.9mmol) 및 디사이클로헥실카보디이미드(9.6mmol)를 클로로포름 100ml에 용해시킨다. 이 용액을 30분 동안 교반시키고, 클로로포름 50ml에 앞에서 용해시킨 N-팔미토일시스테인 3급-부틸 에스테르(2g, 4.8mmol)를 다른 용액에 적가한다. 1.5시간 후, 회전증발기로 용매를 제거하고, 잔류물을 클로로포름/메탄올 1 : 5 100ml에 용해시킨다. 생성물은 -20℃에서 용적이 큰 침전물로서 생성된다. 이를 흡인여과하고 고진공하에서 건조시킨다.

[수율]

2.3g(73%)

[분자량(질량스펙트로미터)]

$C_{39}H_{75}NO_4S(655.20)$

[원소분석]

계산치 : C ; 71.48, H ; 11.71 N ; 2.13, S ; 4.89

실측치 : C ; 71.72, H ; 12.14, N ; 2.12, S ; 4.77

[실리카겔 플레이트상에서의 박층크로마토그래피]

$R_f=0.67$ (이동상 : 클로로포름/에틸 아세테이트=95 : 5)

$R_f=0.73$ (이동상 : 클로로포름/사이클로헥산/MeOH=10 : 7 : 1)

[ $^{13}C$  NMR]

제 4 도 참조

[실시예 11]

[N-( $\alpha$ -테트라데실- $\beta$ -하이드록시옥타데카노일)시스테인 3급-부틸에스테르]

N-( $\alpha$ -팔미토일팔미토일)시스테인 3급-부틸 에스테르(1.5g, 2.3mmol)을 이소-프로판올 10ml에 용해시키고, 여기에 1.5배 물량의 수소화붕소나트륨을 가한다. 이 혼합물을 2시간 동안 교반시키고, 반응이 완결된 후, 수소가 더이상 발생되지 않을때까지 질소로 포화시킨 1N 염산을 가한다. 그 결과 부피가 큰 생성물의 침전이 형성된다. 이를 흡인여과하고 질소로 포화된 물로 수회 세척한 다음 고진공하에서 건조시킨다.

[수율]

1.4g(93%)

[분자량(질량스펙트럼으로 측정)]

$C_{39}H_{77}NO_4S=656.11$

[실리카겔 플레이트 상에서 박층크로마토그래피]

$R_f=0.84$ (이동상 : 클로로포름/에틸 아세테이트=95 : 5)

[원소분석]

계산치 : C ; 71.39, H ; 11.83, N ; 2.13, S ; 4.89

실측치 : C ; 71.32, H ; 12.39, N ; 2.04, S ; 5.33

[실시예 12]

[N-( $\alpha$ -테트라데실- $\beta$ -하이드록시옥타데카노일)시스테인]

N-( $\alpha$ -테트라데실- $\beta$ -하이드록시옥타데카노일)시스테인 3급-부틸 에스테르(1g, 1.5mmol)을 무수트리플루오로 아세트산으로 0.5시간 동안 처리한 다음, 무수 트리플루오로아세트산을 고진공하에서 회전증발기로 제거한다. 잔류물을 3급-부탄올에 용해시키고 동결 건조시킨다.

[수율]

0.7g(78%)

[분자량(질량스펙트럼으로 측정)]

$C_{35}H_{69}NO_4S=600.0$

[원소분석]

계산치 : C ; 70.06, H ; 10.92, N ; 2.33, S ; 5.34

실측치 : C ; 70.36, H ; 10.44, N ; 2.45, S ; 5.01

[실리카겔플레이트상에서 박층크로마토그래피]

$R_f=0.43$ (이동상 : 클로로포름/메탄올/물=65 : 25 : 4)

[실시예 13]

[N,S-디팔미토일시스테인]

N,S-디팔미토일시스테인 3급-부틸에스테르(1g, 1.5mmol)을 무수 트리플루오로 아세트산으로 1시간 동안 처리한다. 고진공하의 회전증발기로 무수 트리플루오로 아세트산을 제거한 다음, 잔류물을 3급-부탄올에 용해시켜 동결건조시킨다.

[수율]

0.8g(89%)

[분자량(질량스펙트럼으로 측정)]

$C_{35}H_{67}NO_4S$ (598.00)

[원소분석]

계산치 : C ; 70.18, H ; 11.44, N ; 2.34, S ; 5.34

실측치 : C ; 69.97, H ; 11.31, N ; 2.50, S ; 5.17

[박층크로마토그래피]

$R_f=0.30$ (이동상 : 클로로포름/메탄올/빙초산 90 : 10 : 1)

$R_f=0.75$ (이동상 : 클로로포름/메탄올/물 65 : 25 : 4)

$R_f=0.81$ (이동상 : 클로로포름/메탄올/암모니아(25%)/물 65 : 25 : 3 : 4)

[ $^{13}C$  NMR]

제 5 도 참조

[실시에 14]

[N-( $\alpha$ -팔미토일팔미토일)-N'-팔미토일시스테인 디-3급-부틸에스테르]

팔미토일 클로라이드(8g, 30mmol)을 질소로 포화된 디메틸포름아미드 40ml에 용해시키고, 여기에 트리에틸아민(60ml, 60mmol)을 가한다. 이 혼합물을 질소기류하에 3시간 동안, 즉, 테트라에틸암모늄 클로라이드가 무색염으로 침전되는 기간동안, 환류하에 교반시킨다. 그 다음 환류용축기를 적가팔대기로 교환하고, 디메틸포름아미드 20ml중의시스테인 디-3급-부틸에스테르(4.9g, 15mmol)용액을 서서히 적가한다. 6시간 후, 용매를 회전증발기로 제거하고, 잔류물을 클로로포름에 용해시키고 5% 농도 아황산칼륨 용액 100ml로 2회 세척하고 물 1.200ml로 1회 세척한다. 유기상을 무수 황산나트륨상에서 건조시키고, 용매를 다시 제거한다.  $-20^{\circ}C$ 에서, N-( $\alpha$ -팔미토일팔미토일)-N'-팔미토일시스테인 3급-부틸에스테르 및 N,N'-디팔미토일시스테인 디-3급-부틸 에스테르의 혼합물이 결정화되며, 클로로포름/메탄올 1 : 1 중의 세파덱스 LH-20상에서 겔여과로써 생성물을 분리한다.

[수율]

6.4g(40%)

[분자량(질량스펙트럼)]

$C_{62}H_{113}N_2O_7S$ (1067.76)

[실리카겔 플레이트상에서 박층크로마토그래피]

$R_f=0.69$ (이동상 : 클로로포름/에틸 아세테이트 91 : 5)

[실시에 15]

[N-( $\alpha$ -팔미토일팔미토일)시스테인 3급-부틸에스테르]

N-( $\alpha$ -팔미토일팔미토일)-N'-팔미토일시스테인 디-3급-부틸에스테르(3.2g, 3mmol)를 소량의 메틸렌 클로라이드에 용해시키고, 9.1N 메탄올성 염산 100ml을 가한다. 이 용액을 음극으로서 은전극, 양극으로서 수은을 사용하는 전해조로 옮기고  $-1.1V$ 의 일정전하로 감소시킨다. 전기화학적 환원반응 말기에는 전류가 약 200mA에서 거의 0으로 떨어진다. 그 다음 회전증발기로 용매를 제거하고, N-( $\alpha$ -팔미토일팔미토일)-시스테인 3급-부틸 에스테르 및 N-팔미토일시스테인 3급-부틸 에스테르를 포함하는 생성물 혼합물을  $-20^{\circ}C$ 에서 메탄올로부터 침전시킨다. 상기의 두가지 화합물을 클로로포름/메탄올 1 : 1 중의 세파덱스 LH-20상에서 겔여과시켜 분리한다.

[수율]

1.5g(76%)

[분자량(질량스펙트럼으로 측정)]

$C_{30}H_{75}NO_4S$  654.09

[실리카겔 플레이트상에서 박층크로마토그래피]

$R_f=0.75$ (이동상 : 클로로포름/ 에틸 아세테이트 95.5)

[원소분석]

계산치 : C ; 71.48, H ; 11.71, N ; 2.13, S ; 4.89

실측치 : C ; 71.16, H ; 11.31, N ; 2.00, S ; 4.65

[실시에 16]

[안정화된  $\alpha$ -나선형 구조의 막 앵커와의 항원 접합체의 제조]

HuIFN- $\alpha$  (Ly)(11-20)-(L-Ala-Aib-Ala-Ala)<sub>2</sub>-OMe, 즉, N-말단에 인체 인터페론의 항원 결정인자( $\alpha$  (Ly))를 갖는 20-펩티드의 합성

말단에 작용성 아미노 그룹을 함유하는 친지방성막 앵커, 즉 H-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe의 합성은 다른 접합체에 적용될 수 있다.  $\alpha$ -나선은 Ala-Aib-Ala-Aib-Ala단위에 의해 1회 또는 2회 연장될 수도 있다. 상기 목적을 위해서는 펜타펩티드 Boc-Ala-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-OMe로부터 개시됨이 유리하다[참조 : R. Oekonomopulos, G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1979, 1151 : H. Schmitt, W. Winter, R. Bosch, G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1982, 1304].

[실시예 17]

[Boc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH의 제조]

① Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OMe

DMF(100ml)중의 Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OMe(15.97g, 50mmol) 및 HOBt(6.67g, 50mmol)를 10℃에서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12mol)중의 HCl×H-Arg(NO<sub>2</sub>)-OMe(13.49g, 50mmol) 및 NMM(5.5ml, 50mmol)에 가하고, 이 혼합물을 -10℃에서 30분간 교반시키고, 0℃에서 1시간 동안, 실온에서 3시간 동안 교반시킨다. 그다음 수방울의 빙초산을 가하여 반응을 종결시킨다. 침전된 Dcu를 여과하여 제거하고, 용매를 고진공하에서 제거한다. 오일성 잔류물을 에틸 아세테이트에 소량의 n-부탄올을 가하여 용해시킨다. 유기상을 5% KHSO<sub>4</sub> 용액, 5% KHCO<sub>3</sub> 용액 및 포화 용액으로 세척한 다음, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 석유 에테르(30 내지 50)을 가하고 이 혼합물을 냉각시켜 침전시킨다.

[수율]

20.30g(76%)

[용점]

130℃(분해)

[박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>( I )=0.69,

R<sub>f</sub>( II )=0.87,

R<sub>f</sub>( III )=0.81,

R<sub>f</sub>( IV )=0.32,

R<sub>f</sub>( V )=0.32.

[분자량 측정]

C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>10</sub>O<sub>9</sub>(534.5)

[원소분석]

계산치(%) : C ; 40.45, H ; 6.41, N ; 26.20

실측치(%) : C ; 40.39, H ; 6.55, N ; 26.11

② HCl×H-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OMe

Boc-Arg-(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OMe(20.00g, 37.42mmol)을 1.2N HCl/아세트산(110ml)와 혼합하고, 30분후, 이 혼합물을 교반시킨 에테르(600ml)에 붓는다. 그결과 박층크로마토 그래피에 의해 정제한 HCl×H-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg-(NO<sub>2</sub>)-OMe가 침전된다.

[수율]

17.3g(98%)

[실리카겔 플레이트상에서 박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>( I )= 0.37,

R<sub>f</sub>( II )=0.29,

R<sub>f</sub>( III )=0.44,

R<sub>f</sub>( IV )=0.07,

R<sub>f</sub>( V )=0.10.

③ Boc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OMe

DMF(75ml)중의 Boc-Asn-OH(8.39g, 36.10mmol) 및 HOBt(4.89g, 36.10mmol)을 -10℃에서 DMF(75ml)중의 HCl×H-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OMe(17.00g, 36.10mmol) 및 NMM(3.98mmol)에 가한다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10ml)중의 DCC(7.53g, 36.50mmol)을 가한후, 이 혼합물을 -10℃에서 30분간 0℃에서 1시간, 실온에서 3시간 동안 교반시킨다. 수방울의 빙초산을 가하여 반응을 종결시킨후, 진공중에서 증발시켜 용매를 제거하고, 잔류물을 소량의 메탄올에 용해시킨다.

이 용액을 교반시킨 건조 에테르에 적가한다. 잔류물을 여과시켜 제거하고 메탄올을 용해시킨다. 냉각시키면 순수한 생성물이 침전된다.

[수율]

18.25g(78%)

[용점]

170℃

[박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>(I)= 0.59,

R<sub>f</sub>(II)=0.67,

R<sub>f</sub>(III)=0.66,

R<sub>f</sub>(IV)=0.45,

R<sub>f</sub>(V)=0.65.

[아미노산 분석]

As×1.00(1), Arg 1.85(2)

[분자량 측정]

C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub>(648.6)

[원소분석]

계산치(%) : C ; 40.74, H ; 6.22, N ; 25.91

실측치(%) : C ; 40.70, H ; 6.40, N 25.79

④ Bpc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH

메탄올(180ml)중의 Boc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OMe(18.00g, 27.75mmol)을 실온에서 1N NaOH(80ml)로 가수분해한다.

2시간후, 이 혼합물을 묽은 HCl로 중화시키고, 이 메탄올을 진공하에 증발시켜 제거하다. 에틸아세테이트를 사용한 추출물을 pH3으로 조절한다. 유기상을 소량의 NaCl포화 용액으로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시킨 다음 이 생성물을 -20℃에서 메탄올성 용액으로 결정화한다.

[수율]

15.84g(90%)

[용점]

228℃(분해)

[박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>(I)= 0.49,

R<sub>f</sub>(II)=0.21,

R<sub>f</sub>(III)=0.26,

R<sub>f</sub>(IV)=0.05,

R<sub>f</sub>(V)=0.21.

[실시예 18]

Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe

① Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH

메탄올(150ml)중의 Boc-Ala-Aib-Ala-OMe(10.03g, 20mmol)을 1N NaOH(40ml, 40mmol)을 사용하여 가수분해한다.

2.5시간 후, 이 혼합물을 1N HCl로 중화시키고, 진공중에 증발시킨다음, EA/5% KHCO<sub>3</sub> (1 : 1,

1,000ml)에 분배한다. 수성상을 5% KHSO<sub>4</sub>를 사용하여 pH 4로 산성화시키고 EA/1-부탄올(5 : 1)로 5회 추출한다. 유기상을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 석유 에테르(30-50)을 가한 다음 냉각시키면, 펜타 펩티드가 침전된다.

[수율]

6.54(65%)

[용점]

195℃(분해)

[박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>( I )= 0.72,

R<sub>f</sub>( II )=0.80,

R<sub>f</sub>( III )=0.87,

R<sub>f</sub>( IV )=0.95,

R<sub>f</sub>( V )=0.80.

[아미노산 분석]

Ala 3.08(3), Aib 1.98(2)

[분자량]

C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>(501.6)

[원소분석]

계산치 : C ; 52.68, H ; 7.84, N ; 13.96

실측치 : C ; 52.70, H ; 7.90, N ; 13.89

② Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe

DMF(100ml)중의 Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH(1.75g, 3.48mmol) 및 HOBt(470mg, 3.48mmol)을 -10℃에서 DMF의 (8ml)중의 HCl×H-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe(1.57g, 3.48mmol) 및 NMM(384ml, 3.48mmol)에 가한다. -10℃에서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3ml)중의 DCC(825mg, 4.00mmol)을 가한 후, 이 혼합물을 15시간 동안 교반시켜 자발적으로 서서히 가온되도록 한다. 수방울의 빙초산을 가하여 반응을 종결시킨후, 원심분리하여 침전된 DCU를 제거하고, 잔류물을 냉 DMF로 2회 세척한 다음, 진공하에서 증발시켜 용매를 제거한다. 잔류물을 CHCl<sub>3</sub>/MeOH( 1 : 1)10ml에 용해시키고, CHCl<sub>3</sub>/MeOH( 1 : 1)중의 세파덱스 LH 20상에서 크로마토그래피한다.

[수율]

2.246g(72%)

[용점]

160℃(분해)

[박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>( I )= 0.61,

R<sub>f</sub>( II )=0.76,

R<sub>f</sub>( III )=0.83,

R<sub>f</sub>( IV )=0.95,

R<sub>f</sub>( V )=0.81.

[분자량 측정]

C<sub>40</sub>H<sub>70</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>(899.1)

[원소분석]

계산치 : C ; 53.44, H ; 7.85, N ; 15.58

실측치 : C ; 53.42, H ; 7.90, N ; 15.40

HCIXH-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe

Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe(2.046g, 2.276mmol)을 1.2N HCl/AcOH(10ml)와 혼합한다. 30분간 교

반시킨후, 하이드로클로라이드 에테르를 침전시키고, 여과시킨후, 오일 펌프진공하 KOH상에서 건조시킨다.

[수율]

1.805g(95%)

[박층크로마토그래피]

$R_f$  ( I )= 0.50,

$R_f$  ( II )=0.38,

$R_f$  ( III )=0.71,

$R_f$  ( IV )=0.48,

$R_f$  ( V )=0.53.

#### ④ Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe

DMF(10ml)중의 Boc-Gln-OH(997mg, 4.05mmol) 및 HOBt(547mg, 4.05mmol)을 -10℃에서 DMF(13ml)중의 HClxH-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe(2.250g, 2.70mmol) 및 NMM(298 $\mu$ l, 2.70mmol)에 가한다. -10℃에서 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(2ml)중의 DCC(846mg, 4.10mmol)을 가한 후, 이 혼합물을 15분동안 교반시켜 자발적으로 서서히 가온되도록 한다. 수방울의 빙초산을 가하여 반응을 종결시키고, 원심분리하여 침전된 DCU를 제거한 다음, 잔류물을 소량의 냉 DMF로 2회 세척하고, 용매를 오일 펌프진공하에 제거한다. 잔류물을 10ml의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>/MeOH(1 : 1)에 용해시키고 CHCl<sub>3</sub>/MeOH(1 : 1)중의 세파덱스 LH20상에서 크로마토그래피한다.

[수율]

2.60g(94%)

[용점]

223℃(분해)

[박층크로마토그래피]

$R_f$  ( I )= 0.66,

$R_f$  ( II )=0.73,

$R_f$  ( III )=0.79,

$R_f$  ( IV )=0.94,

$R_f$  ( V )=0.80.

[분자량 측정]

C<sub>45</sub>H<sub>78</sub>N<sub>12</sub>O<sub>15</sub>( 1027.2)

[원소분석]

계산치 : C ; 52.62, H ; 7.65, N ; 16.36

실측치 : C ; 52.65, H ; 7.68, N ; 16.32

#### ⑤ HCl<sub>2</sub>×H-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe

Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe(2.60g, 2.701mmol)을 1.2N HCl/AcOH(15ml)와 혼합한다.

40분후, 교반시키며 에테르로 하이드로클로라이드를 침전시킨다음, 여과하여 제거하고 오일펌프 진공하의 KOH상에서 건조시킨다.

[수율]

2.209g(85%)

[박층크로마토그래피]

$R_f$  ( I )= 0.48,

$R_f$  ( II )=0.25,

$R_f$  ( III )=0.54,

$R_f$  ( IV )=0.24,

$R_f$  ( V )=0.35.



⑥ Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe

DMF(12ml)중의 Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OH(760mg, 1.07mmol) 및 HOBt(145mg, 1.07mmol)를 실온에서 DMF(10ml)중의 HClxH-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe(818mg, 0.85mmol) 및 NMM(94 $\mu$ l, 0.85mmol)에 가한다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5ml)중의 DCC(227mg, 1.10mmol)을 가한 후, 혼합물을 64시간 동안 교반시킨다. 수방울의 빙초산을 가하여 반응을 종결시킨 후, 원심분리하여 침전된 DCU를 제거한 다음, 잔류물을 소량의 냉 DMF로 2회 세척하고, 오일 펌프진공하에 용매를 제거한다. 잔류물을 CHCl<sub>3</sub> /MeOH(1 : 1)8ml에 용해시키고 CHCl<sub>3</sub> /MeOH(1 : 1)중의 세파덱스 LH-20상에서 크로마토그래피한다.

[수율]

7.74mg(57%)

[용점]

260℃(분해)

[박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>( I )= 0.80,

R<sub>f</sub>( II )=0.86,

R<sub>f</sub>( III )=0.91,

R<sub>f</sub>( IV )=0.77,

R<sub>f</sub>( V )=0.78.

[아미노산 분석]

Glx 1.00(1), Ile 0.89(1), Leu 3.10(3),

Aib 4.08(4), Ala 7.95(8)/

[분자량 측정]

C<sub>75</sub>H<sub>122</sub>N<sub>16</sub>O<sub>21</sub>( 1622.0)

[원소분석]

계산치 : C ; 55.54, H ; 8.20, N ; 15.54

실측치 : C ; 55.58, H ; 8.31, N ; 15.52

[실시에 19]

[Boc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Ala-Leu-Ile-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe의 제조]

① HClxH-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe

Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe(754mg, 0.465mmol)을 1.2N HCl/AcOH(10ml)와 혼합한다. 50분후, 이 혼합물을 오일 펌프진공하에 일부 증발시키고, 물(10ml)를 가한후, 동결 건조시킨다.

[수율]

690mg(95%)

[박층크로마토그래피]

R<sub>f</sub>( I )= 0.71,

R<sub>f</sub>( II )=0.52,

R<sub>f</sub>( III )=0.78,

R<sub>f</sub>( IV )=0.56,

R<sub>f</sub>( V )=0.54.

② Boc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe

DMF(5ml)중의 Boc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH(634mg, 0.995mmol) 및 HOBt(135mg, 1.13mmol)을 -5℃에서 DMF(7ml)중의 HClxH-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe(20mg, 0.398mmol) 및 NMM(44 $\mu$ l, 400 $\mu$ mol)에 가한다. -5℃에서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5ml)중의 DCC(217mg, 1.05mmol)을 가한 후, 혼합물을 48시간 동안 교반시켜 자발적으로 가온되도록 한다. 3방울의 빙초산을 가하여 반응을 종결시키고, 침전된 DCU를 원심분리하여 제거한다. 전술한 바와 같이 후처리하고, 크로마토그래피로 정제한다.

다.

[수율]

630mg(74%)

[용점]

195℃(분해)

[박층크로마토그래피]

$R_f(I) = 0.70$ ,

$R_f(II) = 0.51$ ,

$R_f(III) = 0.56$ ,

$R_f(IV) = 0.45$ ,

$R_f(V) = 0.68$ .

[아미노산 분석]

Asx 1.00(1), Glx 1.00(1), Ile 0.89(1),

Leu 3.16(3), Arg 1.95(2).

[분자량 측정]

$C_{91}H_{160}N_{30}O_{29}$ (2138.5)

[원소분석]

계산치 : C ; 51.11, H ; 7.54, N ; 19.65

실측치 : C ; 51.14, H ; 7.60, N ; 19.66

[실시예 20]

[유리 아이코사펩티드의 제조]

① Boc-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe × 2HCl

무수 메탄올 3ml 중의 Boc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe(350mg, 0.164mmol)을 Pd/활성탄소 35mg 및 6N HCl 12(0.075mmol)와 혼합한다. 실온에서 교반시키며 수소를 용액에 통과시킨다. 20분후 20μl(49μmol), 35분후 7μl(42μmol)의 6N HCl을 가한다. 약 50분간 수소화시킨후, 분해는 TLC에 의해 확인한 결과 정량적이다. 여과하여 촉매를 제거하고 소량의 메탄올로 수회 세척한다. 회전증발기에서 증류시켜 용매를 바르게 제거한다(오일 펌프 진공, 25℃의 온도).

잔류물을 소량의 물에 용해시켜 동결 건조시킨다.

[수율]

332mg(95%)

[박층크로마토그래피]

$R_f(I) = 0.16$ ,

$R_f(II) = 0.11$ ,

$R_f(III) = 0.21$ ,

$R_f(IV) = 0.10$ ,

② H-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe × 2HCl

Boc-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>2</sub>-OMe × 2HCl(600mg, 0.283mmol)를 1.2N HCl/AcOH(5ml)와 혼합한다. 30분후, 이 혼합물을 회전증발기로 일부 증발시키고, 잔류물을 물(10ml)과 혼합하여 동결건조시킨다.

[수율]

564mg(97%)

[용점]

245℃(분해)

[박층크로마토그래피]

$R_f(I) = 0.11$

[분자량 측정]

$C_{86}H_{157}N_{28}O_{23}$  (2057.7)

[원소분석]

계산치 : C ; 50.20, H ; 7.69, N ; 19.06, Cl ; 5.17

실측치 : C ; 50.31, H ; 7.78, N ; 18.95, Cl ; 5.28

[실험물질 및 실험방법]

[화학물질]

분석용 용매는 머크(Merck)제품이며, 그밖의 용매는 통상의 방법으로 건조시키고 증류시킨다. N-메틸모르폴린(머크)은 닐히드린상에서 증류시켜 2급아민을 제거한다. 1-하이드록시벤조트리아졸 및 디사이클로헥실 카보디이미드 역시 머크제품이다. 모든 L-아미노산 유도체는 베컴(Bachem)제품이다. Boc-Aib-OH 및 H-Aib-OMexHCl은 문헌의 방법대로 합성한다.

[박층 크로마토그래피]

예비피복된 실리카겔 60F<sub>254</sub>플레이트(머크제품) 및 하기의 이동상이 사용된다.

(I) 1-부탄올/빙초산/물 3 : 1 : 1

(II) 클로로포름/메탄올/빙초산/물 65 : 25 : 3 : 4

(III) 클로로포름/메탄올/농축 암모니아/물 65 : 35 : 3 : 4

(IV) 클로로포름/메탄올/물 65 : 25 : 4

(V) 클로로포름/메탄올 1 : 1

하기의 분무시약을 사용한다. 닐히드린시약, 염소/4,4'-비스(디메틸아미노)디페닐메탄(TDM시약) 및 사카구치(Sakaguchi)시약 사용된 기준물질은 다음의 값을 갖는 디사이클로헥실우레아이다.

$R_f(I) = 0.91,$

$R_f(II) = 0.82,$

$R_f(III) = 0.92,$

$R_f(IV) = 0.81,$

$R_f(V) = 0.83.$

[아미노산 분석]

중간체의 동일성을 확인하기 위하여, 약 200 $\mu$ g의 각 보호펩티드시료를 110℃에서 24시간 동안 6N HCl중에서 가수분해시킨다. Leu-Leu결합을 함유하는 핵사펩티드 단편의 중간체 및 표적서열을 동일한 조건하에서 72시간 동안 가수분해한다. 아미노산 분석은 표준프로그램을 사용하는 바이오트로닉(Biotronic) LC 6000E 아미노산 분석기로 수행한다.

[라세미체 측정]

가수분해된 아미노산은 펜타플루오로프로피오닐 아미노산의 n-프로필 에스테르로서 유도되며, 거울상체는 키라실-발(Chirasil-Val)을 사용하는 유리모세관 컬럼상에서 가스크로마토그래피하여 분리한다. D-아미노산의 보고된 비율은 가수분해에 의해 야기된 라세미화와 일치하지 않는다.

[원소분석]

단순한 C, H 및 N측정은 모델 1104(Carlo. Erba, Milan)원소분석기를 사용하여 수행한다.

[용점]

용점은 토톨리(Tottoli)에 따라 측정하고 보정하지 않았다.

[스펙트럼 기록]

<sup>13</sup>C NMR 스펙트럼 : 보호 아이코사펩티드 30mg를 <sup>12</sup>C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>/<sup>12</sup>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>H(1 : 1)(머크사제품)400 $\mu$ l에 용해시키고 WM 400 Bruker NMR스펙트로미터로 30℃에서 12시간동안 측정한다. 원형이색성 스펙트럼 : 에탄올, 트리플루오로 에탄올, 메탄올, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올, 물 및 에탄올/물 혼합물 중의 유리 아이코사펩티드(C=1-1.7mg/ml)용액을 디크로그래프 II (Jouhan-Roussel)에서 측정한다.

[크로마토그래피에 의한 정제]

커플링 반응을 종결시키고 오일 펌프진공하에 용매를 제거한 후, 보호펩티드 중간체를 동일 용적의 CHCl<sub>3</sub>/MeOH(1 : 1)을 가함으로써 용해시키고, 원심분리하여 디사이클로헥실우레아를 제거하고, 생성물을 세파덱스 LH 20[컬럼 3×115cm ; 용출제 CHCl<sub>3</sub>/MeOH(1 : 1) ; 적용량 35ml ; 유속

8.40ml/10분]상에서 크로마토그래피한다. 3ml분획을 시스템 II (TDM시약)중에서 박층크로마토그래피

에 의해 시험한다. 펩티드가 용출액 165내지 190ml에서 나타난다. 분획을 합하고, 진공중에서 용매를 제거하고, 잔류물을  $P_2O_5$  상에서 건조시킨다. 아미노산 분석으로 기대하는 값 및 92 내지 96%의 펩티드 함량이 생성됨을 확인한다.

#### [면역시험]

우선, 뚜렷한 담체인 동시에 활성이 큰 보조제인 B-세포 유사분열물질을 합성 항원성 결정인자에 공유 결합시킨다. 이러한 목적으로, 특히 에스케리키아 콜라이의 외막으로부터의 지방단백질의 N-말단인 합성지방펩티드 S-2,3-비스(팔미토일옥시)프로필)-N-팔미토일시스테인세린(Pam<sub>3</sub> Cys-Ser)을 사용한다. 항원에 공유결합될 때 두드러지는 양쪽성 특성은 한편 세포막의 지방층에 세개의 지방산 잔기를 갖는 S-글리세릴 화합물을 안정하게 결합시킨다. 다른 한편, 이는 보다 극성인 항원(또는 항원)이 막의 침수외층에 존재함을 의미한다. 지방 단백질의 활성효과는 그의 N-말단부에 의해 완전히 측정되므로, Pam<sub>3</sub> Cys-Ser 또는 이의 유사체의 면역자극제 효과는 이를 갖는 모든 접합체에서 유지된다.

실례로서, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R)에 대한 특이항체 생성개념을 사용하여 자세히 설명하였다(제 9 도). 이러한 목적을 위해, 에피토프에 대한 컴퓨터 탐색으로 메리필드 합성법에 의해 구성된 세포외형질영역 516-529를 선택하며, 최종적으로 Fmoc-Ser(But)-OH 및 Pam<sub>3</sub> Cys-OH를 부착시킨다. 분석에 의해 균질화 상태인 것으로 밝혀진 접합체를 수지로부터 분해하여, 부가물을 더 가하지 않고 마우스에 단일용량으로 복강내투여한다. 단지 2주후, 테트라데카펩티드에 대한 특이항체의 고역가를 ELISA에 의해 확인한다. 대조시험으로, 그 자체가 명백하게 약한 면역체인 테트라데카펩티드를 사용하여서는 어떠한 항체 역가도 수득되지 않는다.

Pam<sub>3</sub> Cys접합체가 세포배지에서 매우 높은 면역원성이므로, 시험관내 면역화에 의해 약한 면역원성 화합물에 대해 통상의 모노클로날 항체를 빠르고 훌륭하게 수득할 수 있다.

세포 배양액에 관한 본 발명의 장점은 다음과 같다 : 원하는 양의 화학적으로 명확히 정의되는 항원-보조제 접합체 체제를 다른 접합체와는 달리 다수의 추가투여없이 1회 투여하여, 생체내 및 시험관내에서 우수한 효과를 얻는다. 실험 동물에서 안정하고 종종 생체내 면역화조차 필요하지 않으며 특히 유전공학방법에 있어서 시간이 매우 절약됨이 명백하다. 실험은 인체세포 배양시스템으로 수행할 수도 있다.

#### [생체내 면역의 실시예]

6주에서 10주된 Balb/c마우스에 Pam<sub>3</sub> Cys-Set-(EGF-R 515-529)50 $\mu$ g 및 500 $\mu$ g(항원에 공유 결합된 보조제  $10^{-1}$  내지  $10^{-2}$  M 용액 0.2ml)을 1회 복강내투여하여 면역시킨다. 사용된 대조군은 항원, 보조제, 항원과 보조제의 혼합물이며, 각 경우에서 몰 양 및 매질에 대해 비교하였다. 주사 2주후, 혈장을 얻기위해 마우스의 후 안화 정맥총(retroorbital venous plexus)에서 혈액을 채취하여, ELISA로 항체 역가를 측정한다.

유사한 면역을 다른 투여방법, 예를 들면 정맥내 투여, 경구투여, 직장내투여, 근육내투여, 피하투여 등으로 얻을 수 있다.

생체면역 후, 테트라아데카펩티드 EGF-R516-529에 대한 프로인트 보조제 없이 특이항체의 형성을 조사하였다.

Balb/c 마우스에 접합체 0.2 $\mu$ m를 복강내 주사하여 면역시켰다.

I. 접합체 Pam<sub>3</sub> Cys-Ser(EGF-R 516-526)

II. 유리 테트라아데카펩티드 EGF-R 516-529단독

III. Pam<sub>3</sub>Cys-Ser 단독

IV. Pam<sub>3</sub>Cys-Ser 과 유리테트라아데카펩티드(EGF-R516-529)의 혼합물[제 10 도 참조].

항체역가는 ELISA로 측정한다[405nm에서의 광학밀도](제 10 도).

면역 14일후 안정액에서 혈액을 채취하여 여기서 얻은 혈장을 ELISA에서 사용한다. 수지는 PEP 14-BSA접합체와 BSA의 ELISA값의 차이의 평균(3-5마우스)으로 나타난다(제 10 도).

본 발명의 막 앵커/활성화합물 접합체가 사용되는 경우, 선행방법으로 수회 반복하여 얻은 효과를 증가하는, 매우 증가된 항체농도가 나타남이 명백하다.

#### [실험관내 면역의 실시예]

마우스 비장세포 시료를 접합체 Pam<sub>3</sub> Cys-Ser-(EGF-R515-529), 보조제 Pam<sub>3</sub> Cys-Ser, 테트라아데카펩티드 EGF-R 516-529, 항원과 보조제의 혼합물, 및 매질등이 존재하는 곳에서 5일간 배양시킨다.

임파구는 10% 열-불활성화 FCS, 글루타민(2mM), 페니실린(100U/ml), 스트렙토마이신(100 $\mu$ g/ml) 및 2-머캅토 에탄올( $5 \times 10^{-5}$  M)로 보강된 RPMI-1640배지 0.2ml 분취량에서, 세포밀도  $2.5 \times 10^6$  ml로 48시간 동안 배양시킨다.

ELISA로 특이항체를 조사하기 위하여 상청액을 채취한다.

[마우스 비장세포와 유사분열성 활성화]

Pam<sub>3</sub>-Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> -FITC(환상), Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> -OH×3HCl(삼각형) 및 Pam Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-OH×2FTA(사각형)에 의한 Balb/c 비장세포의 유사분열성 활성화는 제 12 도에 나타내었다. 세포 배양조건은 문헌에 나타나 있다[참조 : Z. Immunforsch. 153, 1977 11페이지 이하 및 Eur. J. Biochem. 115, 1981]. 도면에서, <sup>3</sup>H-티미딘을 DNA로 혼입시키는 경우의 자극지수(유사분열물질이 없는 대조군 cpm에 대한 혼입된 물질 cpm)를 사용한 활성화화합물의 농도에 대해 세로축에 나타내었다.

[생체내/시험관내 비교]

제 11 도에는 전술한 생체내실험을 시험관내 실험과 비교하여 나타내었다 :

미소역가판상의 시험관내 실험 :

세포밀도 :  $2.5 \times 10^6$  세포/ml ;

물질농도 :  $5 \times 10^{-7}$  mM ;

배양조건 : 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5일.

접합체 : 접합체 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(EGF-R515-529)

펩티드 : 테트라데카펩티드 EGF-R516-529

보조제 : Pam<sub>3</sub>Cys-Ser

혼합물 : 유리 테트라데카펩티드 EGF-R516-529와 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser의 혼합물.

항체농도의 심한상승이 실험관내 실험에서도 나타났는데, 이는 특히 항체제조에 있어서, 세포배양액의 유용성을 상당히 확대시킨다.

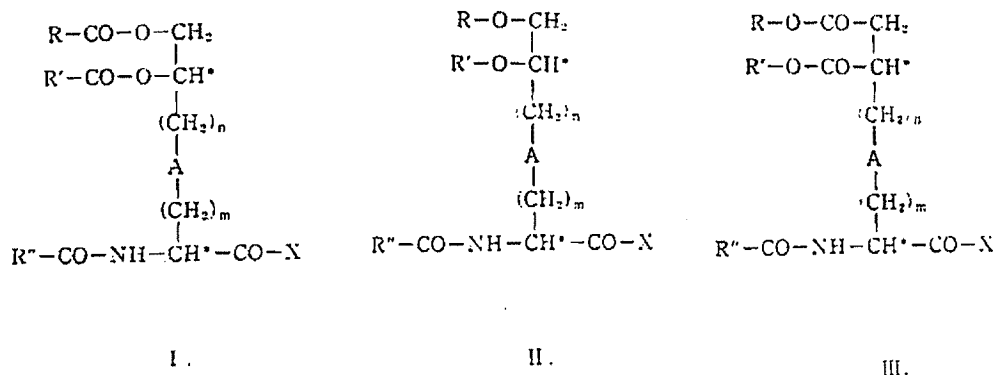
#### (57) 청구의 범위

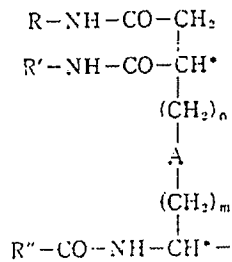
##### 청구항 1

중합체(예를들어, 메리필드수지)등의 고체 또는 가용성 담체상에서 커플링방법에 의해, 반응이 일어나지 않도록 작용기를 보호그룹으로 보호시킨 펩티드를 합성하고; 이렇게 합성된 담체-결합 펩티드를 펩티드의 N-말단 또는 측쇄기를 통해 막 앵커(anchor) 화합물에 공유결합시키고; 제조된 펩티드 접합체를, 보호그룹과 펩티드/담체 결합을 분해시킴으로 분리하여, 막 앵커/펩티드 또는 막 앵커/활성 화합물 접합체를 수득함을 특징으로 하여, 하나 이상의 막 앵커 화합물과, 막 앵커 화합물(들)에 공유결합된 하나 이상의 활성화화합물을 함유하는 막 앵커/활성 화합물 접합체를 제조하는 방법.

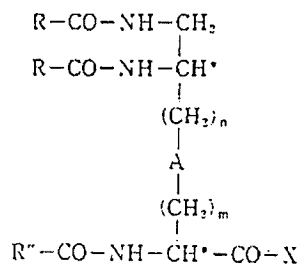
##### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 막 앵커 화합물이 하기 일반식이 화합물인 방법 :

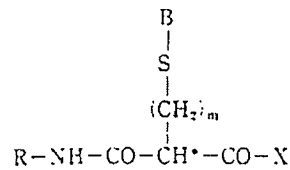




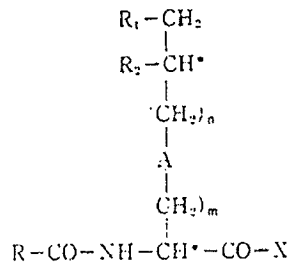
IV.



V.



VI.



VII.

상기식에서, A는 황, 산소, 디설파이드(-S-S-), 메틸렌(-CH<sub>2</sub>-) 또는 -NH-일 수 있고, B는, A가 -S-S-인 일반식(I) 내지(IV)에서와 같이, 치환된 S-알킬 라디칼, 즉, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-(치환된 알킬)-라디칼이며, n은 0 내지 5 이고, m은 1 또는 2 이며, C\*은 R 또는 S 배위를 갖는 비대칭 탄소원자이고, R, R' 및 R'' 는 동일하거나 상이하며, 탄소수 7 내지 25의 알킬, 알케닐, 또는 알키닐 그룹이거나 수소로서, 하이드록실, 아미노, 옥소, 아실, 알킬, 또는 사이클로 알킬그룹으로 임의 치환될 수 있으며, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub> 는 동일하거나 상이하며, R, R' 및 R''의 정의와 같거나, -OR, -OCOR, -COOR, -NHCOR 또는 -CONHR일 수 있고, X는 활성화화합물 또는 스페이서(spacer)-활성화합물 그룹이다.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 막 앵커 화합물[예를 들어, N,N'-디아실리신 ; N,N'-디아실오르니틴; 글루탐산의 디(모노알킬)아미드 또는 에스테르, 아스파르트산의 디(모노알킬)-아미드 또는 에스테르, 세린, 호모세린 또는 트레오닌의 N,O-디아실 유도체, 및 시스테인 또는 호모시스테인의 N,S-디아실 유도체; 세린 및 호모세린]과의 활성화화합물 접합체일 수 있는 하기 일반식(VIII)의 막 앵커/활성 화합물 접합체를 제조하는 방법.



상기식에서, R<sub>3</sub>는 탄소수 7 내지 25, 바람직하게는 탄소수 10내지 20, 특히 바람직하게는 탄소수 14 내지 18의 α-아실-지방산 잔기 ; 에스테르 그룹이 바람직하게는 직쇄 또는 측쇄이고 탄소수 8이상, 바람직하게는 약 10 내지 20 및 특히 바람직하게는 탄소수 14 내지 18인 α-알킬-β-하이드록시-지방산 잔기 또는 이의 β-하이드록시에스테르이고, R<sub>4</sub>는 아미노산의 측쇄이거나 수소이며, X는 수소 또는 스페이서-활성 화합물 그룹이고, R<sub>4</sub>가 리신, 오르니틴, 글루탐산, 아스파르트산 또는 이들의 유도체의 측쇄인 경우 결합될 막 앵커 화합물은 동일한 분자의 α 또는 ω 위치에서 에스테르방법 및 아미드방법에 의해 R<sub>4</sub>에 결합될 수 있다.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 막 앵커 화합물이 Pam<sub>3</sub>Cys 또는 Pam<sub>3</sub>Cys-Ser 또는 Pam<sub>3</sub>Cys-(1 내지 100아미노산함유)펩티드인 방법.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 막 앵커 화합물이 PamCys (Pam) -OH 또는 Pam(α-Pam)-Cys[Pam(α-Pam)]-OH인 방법.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 막 앵커 화합물이 α-알킬-β-하이드록시아실-펩티드(마이콜릴펩티드)(펩티드쇄

는 1 내지 10의 아미노산을 갖는다)인 방법.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 막 앵커 화합물이 S-(1,2-디옥타데실옥시카보닐에틸)시스테인 또는 이 화합물의 동족체인 방법.

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서, 막 앵커 화합물이  $\alpha$ -알킬 아미노산에 의해 구조적으로 안정화된 나선이며, X-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>n</sub>-Y형태(여기서, n은 2 내지 4 이고, X 및 Y는 공지된 보호그룹, -H, -OH 또는 -NH<sub>2</sub>이며, Ala는 다른 아미노산으로 교체될 수도 있다)의 다른 아미노산을 갖는 방법.

#### 청구항 9

제 1 내지 8 항중 어느 한항에 있어서, 활성 화합물이 두개의 임의로 서로 다른 막 앵커 화합물에 공유 결합된 방법.

#### 청구항 10

제 1 내지 8 항중 어느 한항에 있어서, 활성 화합물이 면역화 목적으로 공지된 보조제(예를 들어, 무라밀디펩티드 및 /또는 지방다당류)에 추가로 공유결합된 방법.

#### 청구항 11

제 1 내지 8 항중 어느 한 항에 있어서, 활성 화합물이 항원[예를 들어, 단백질 또는 접합단백질(예를 들어, 당단백질, 바이러스 외피단백질, 세균세포벽 단백질 또는 프로토조아(항원 결정인자, 에피토프)의 단백질]의 저분자량 부분서열], 세균 막성분(예를 들어, 무라밀디펩티드, 지방다당류), 천연 또는 합성 합텐, 항생물질, 호르몬, 뉴클레오사이드, 뉴클레오티드, 핵산, 효소, 효소기질, 효소억제물질, 비오틴, 아비딘, 폴리에틸렌 글리콜, 펩티드성 활성화화합물(예를 들어, 투프트신, 폴리리신), 플루오레센스 표지물 FITC, RITC, 덴실, 루비놀 또는 코우마린, 바이오루미네센스 표지물, 스피인 표지, 알칼로이드, 스테로이드 바이오겐성 아민, 비타민 또는 독성물질(예를 들어 디곡신, 팔로이딘, 아마니틴, 테트로독신 등), 착물-형성제 또는 약인 방법.

#### 청구항 12

제 1 내지 8 항중 어느 한항에 있어서, 다수의 막 앵커/활성 화합물 접합체 화합물이 지방부위 및/또는 활성 화합물 부위에 가교결합된 방법.

#### 청구항 13

제 1 내지 8 항중 어느 한 항에 있어서, 막 앵커 화합물 및 활성 화합물이 디카복실산 유도체, 디올, 디아민, 폴리에틸렌 글리콜, 에폭사이드, 말레산 유도체 등의 가교 결합체를 통해 공유결합된 방법.

#### 청구항 14

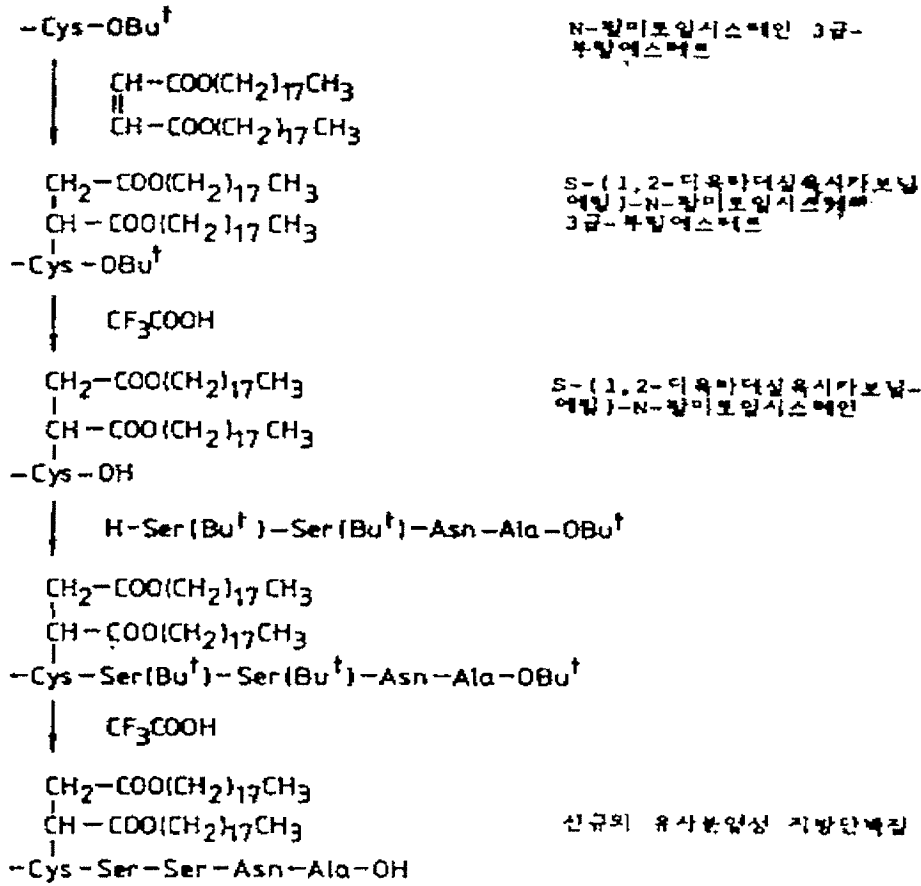
제 1 항에 있어서, 펩티드/막 앵커 결합이 축합, 첨가, 치환 또는 산화반응(예를 들어, 디설파이드 형성)에 의해 형성되는 방법.

#### 청구항 15

제 1 또는 14 항에 있어서, 막 앵커 화합물이 제 2 내지 8항의 화합물, 특히 Pam<sub>3</sub>Cys, Pam<sub>3</sub> Cys-Ser, S-[1,2-디카복시알킬에틸]시스테인, X-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>n</sub>-Y(여기서, n은 2 내지 4이고, X 및 Y는 문헌에 공지된 보호그룹이거나, -H, -OH 또는 -NH<sub>2</sub> 이다), Pam( $\alpha$ -Pam)-펩티드, 마이콜릴펩티드 또는 이의 유도체이거나; Pam-Cys(Pam), Pam-Lys(Pam), Pam-Orn(Pam) ; Pam-Ser(Pam) 또는 글루탐산의 디(헥사데실아미드)인 방법.

도면

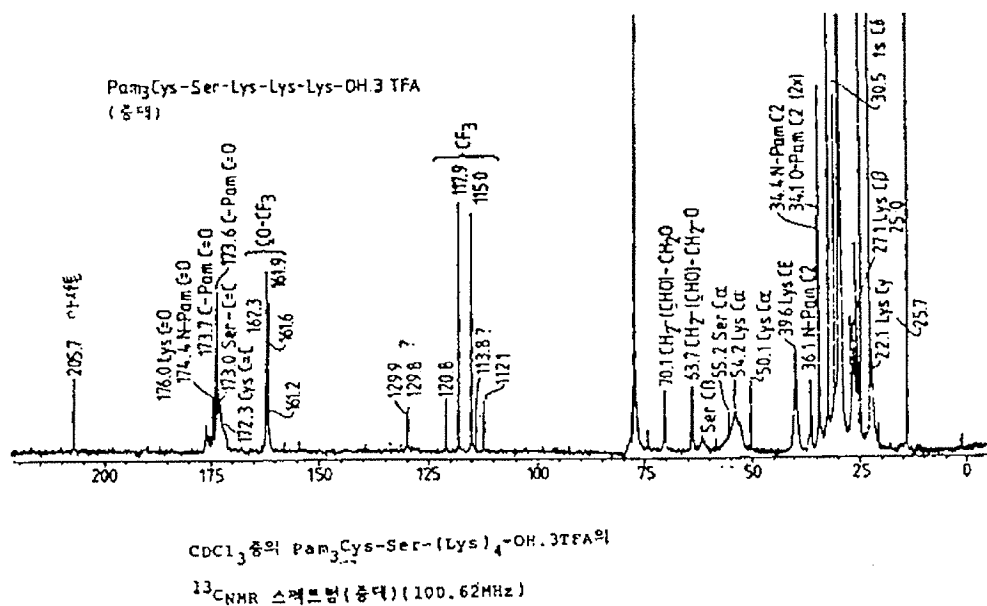
반응도식 3



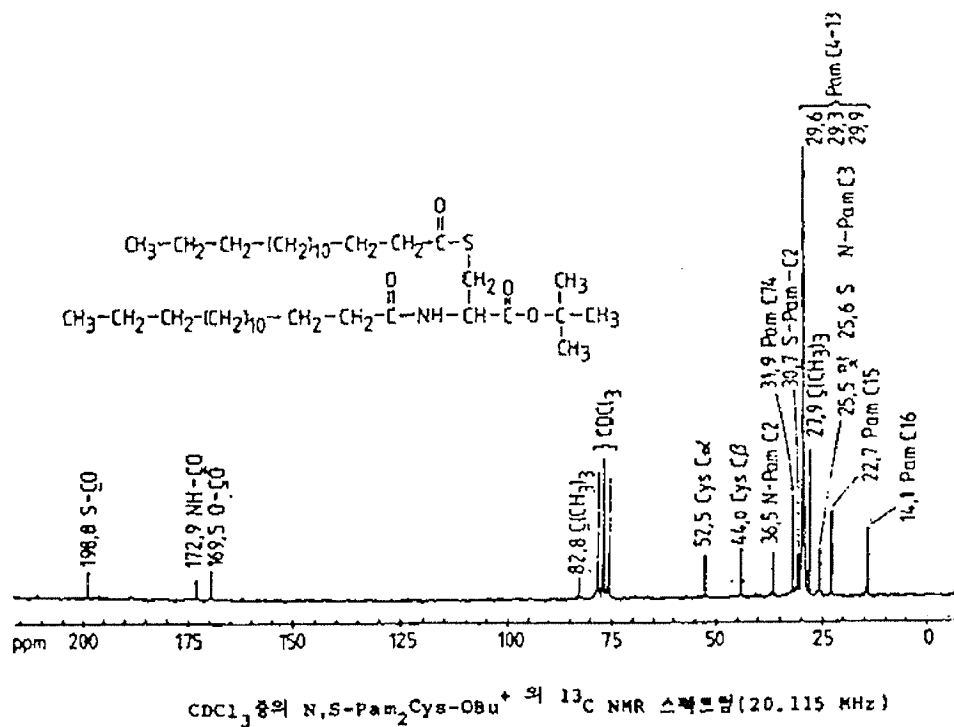
도면2-계속



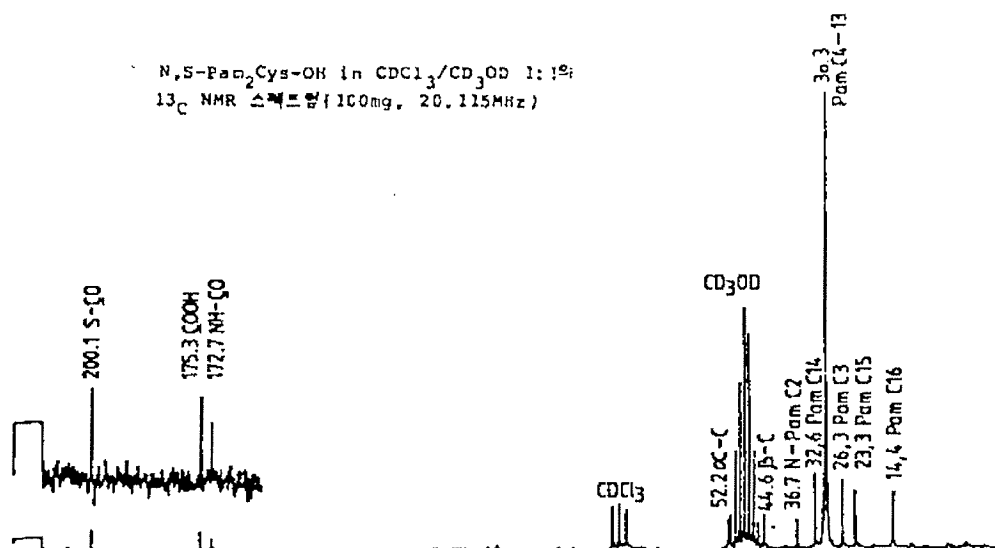




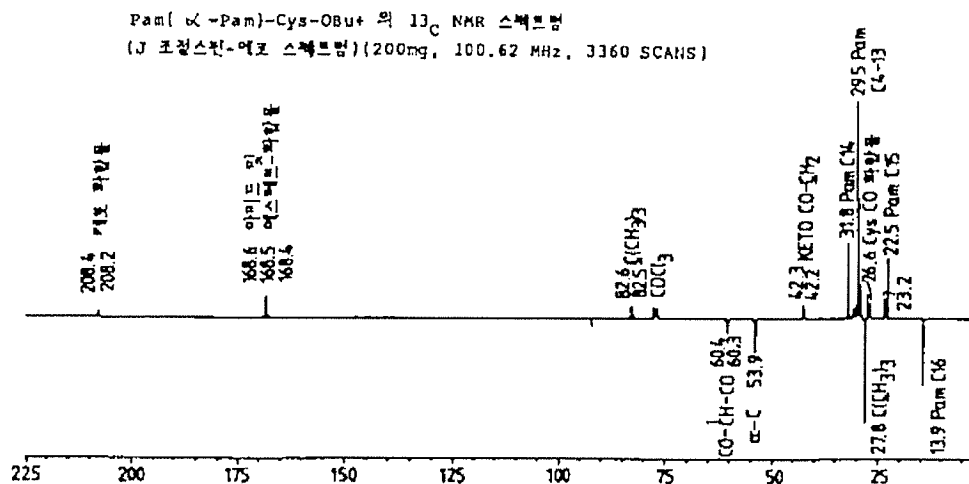
도면4



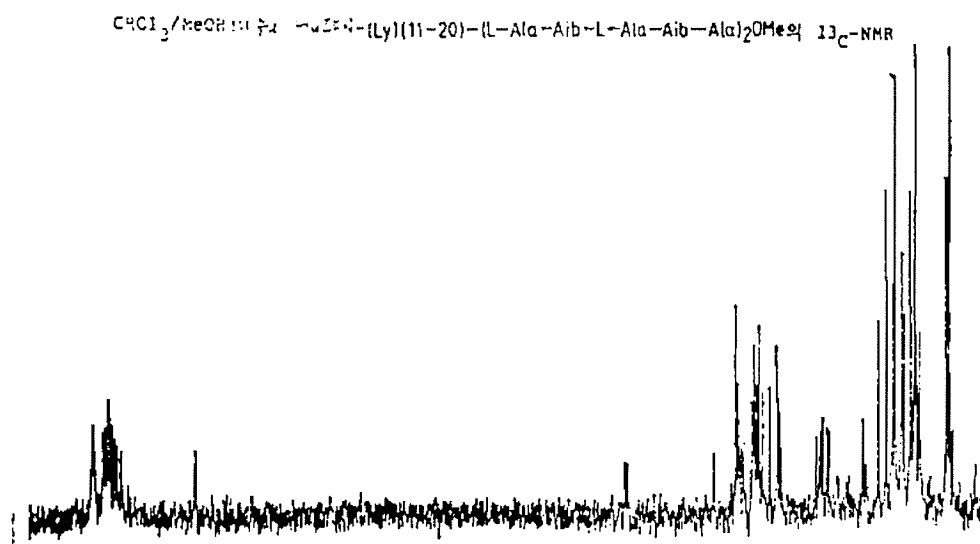
도면5



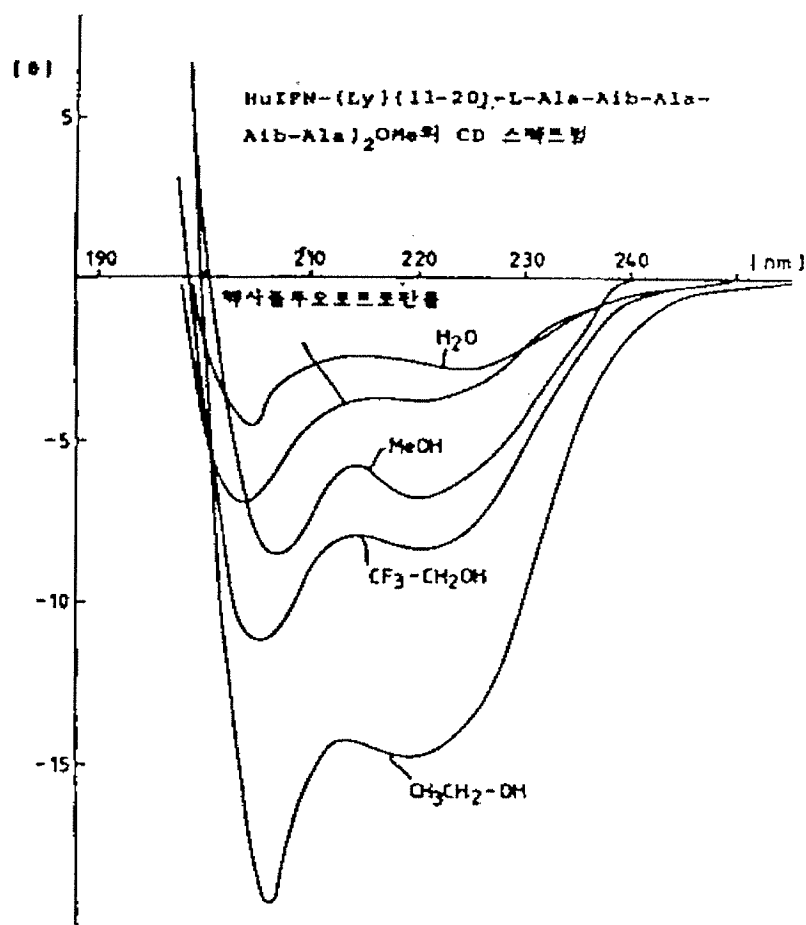
도면6



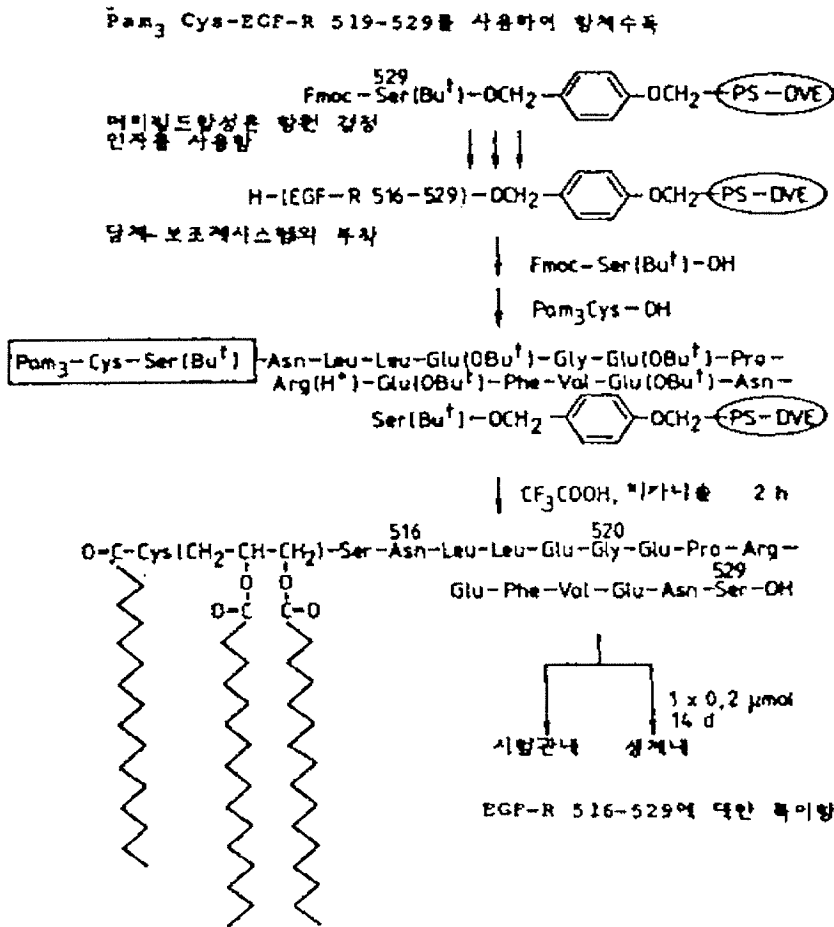
도면7



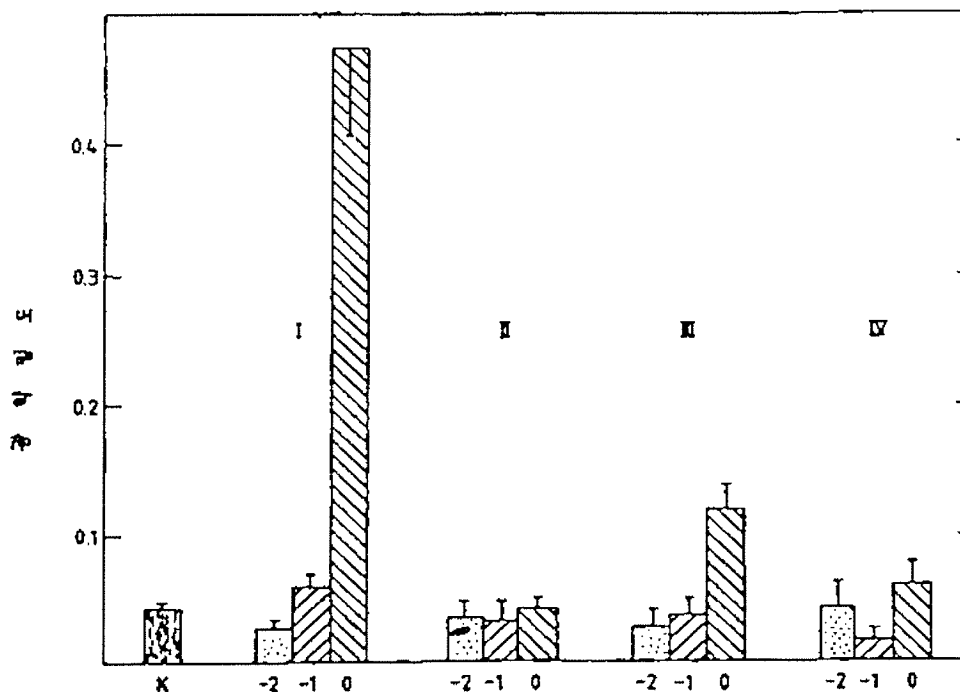
도면8



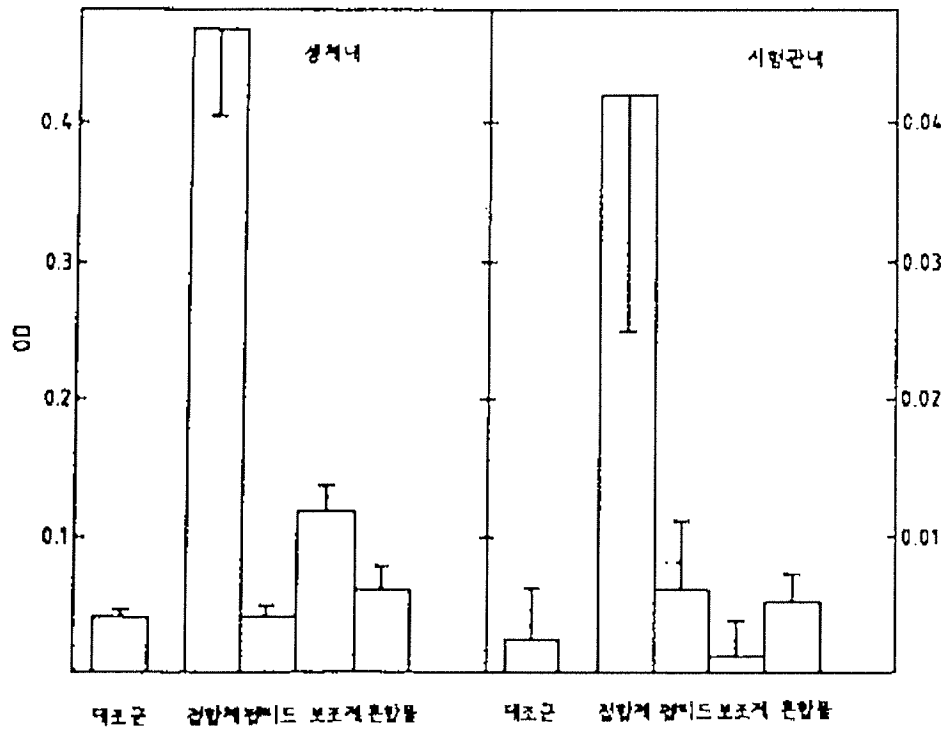
도면9



도면10



도면11



도면12

